



**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos**

Tesis de Doctorado

**“Respuestas de las plantas frente a la radiación UV-B:  
reparación del daño al ADN, regulación de la expresión génica y  
de la progresión del ciclo celular”**

Presentada por: Lic. María Sol Gomez

Directora: Dra. Paula Casati

Co-directora: Dra. María Lorena Falcone Ferreyra

Rosario – Argentina

**2019**

Respuestas de las plantas frente a la radiación UV-B: reparación del daño al ADN,  
regulación de la expresión génica y de la progresión del ciclo celular.

María Sol Gomez  
Licenciada en Biotecnología

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Departamento de Química Biológica, Área Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 5 de mayo de 2014 y el 27 de diciembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Paula Casati y la co-dirección de la Dra. María Lorena Falcone Ferreyra.

Directora Dra. Paula Casati.....

Co-directora Dra. María Lorena Falcone Ferreyra.....

Jurado.....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida.....

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se dieron a conocer en Publicaciones y Presentaciones en Congresos Científicos, como se detalla a continuación:

## **PUBLICACIONES**

- Gomez, M. S.; Falcone Ferreyra, M. L., Sheridan, M. L. y Casati, P. (2018) Arabidopsis E2Fc is required for the DNA damage response under UV-B radiation epistatically over the microRNA396 and independently of E2Fe. *Plant J*, doi: 10.1111/tpj.14158.

## **CONGRESOS CIENTÍFICOS**

- Gomez, M. S.; Casati, P. "Study of the effect of UV-B radiation on the Retinoblastoma pathway in *Arabidopsis thaliana*". Poster. LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Argentina, 2015.
- Gomez, M. S.; Falcone Ferreyra, M. L.; Casati, P. "Estudio de la vía del microARN 396 y los factores de transcripción GRF en la respuesta a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*". Poster. III Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos, GRAFOB del Bicentenario. San Miguel de Tucumán, Argentina, 2016.
- Gomez, M. S.; Falcone Ferreyra, M. L.; Casati, P. "Estudio del efecto de la radiación UV-B en el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y el rol de los factores de transcripción E2F. Poster. Simposio de Genómica Funcional de Plantas. Rosario, Argentina, 2017.
- Gomez, M. S.; Falcone Ferreyra, M. L.; Casati, P. "E2F transcription factors role in the development of *Arabidopsis thaliana* plants under UV-B radiation". Poster. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Argentina, 2017.
- Gomez, M. S.; Falcone Ferreyra, M. L.; Casati, P. "Role of E2Fc transcription factor during UV-B responses in *Arabidopsis*". Comunicación oral. LIV Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Paraná, Argentina, 2018.

### Otras publicaciones científicas:

- Dotto, M.; Gomez, M. S.; Soto, M. S. y Casati, P. (2018) UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 421, 1394-1406.

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Paula, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza, el optimismo y el incentivo a la superación. A Lore, mi co-directora, por la ayuda constante, las sugerencias, la dedicación y los detalles. Gracias por todo lo que me enseñaron.

A todos los que fueron y son integrantes del Lab 1 y del Lab 2, gracias por el día a día, por el compañerismo, por compartir sus conocimientos, por la buena predisposición, las risas y los mates. Particularmente a Evi, Sil, Valen, Lu, Romi y Juli, gracias por la amistad, por los momentos de catarsis y por hacer del Lab un lugar especial. También quiero agradecerle a María, por ayudarme a avanzar con mi Tesis, por la paciencia y el esmero.

A mis compañeros de CEFOBI, por los almuerzos, las horas compartidas en los cursos, las charlas, los HH y la buena onda.

Al grupo de profes nuevas de Química Biológica, Agus y Sil, por las horas de estudio, las consultas y el compañerismo.

A mis amigas de la Facu, la banda Nerd, por la amistad, la alegría, el apoyo incondicional, por el empuje. Es un lujo haberlas encontrado al principio del camino y que lo hayamos recorrido juntas.

A mis amigas de Cañás, Romi, Geri y Sole, por las salidas, las risas, la comprensión, por estar siempre.

A mi familia, muy especialmente a mi mamá y a mi hermana. Ma, gracias por ayudarme tantas veces, por el optimismo, los valores y el ejemplo, te admiro! A Migue, por la compañía, las sugerencias, y la incondicionalidad. Por los momentos divertidos, tan necesarios! A las dos, gracias infinitas! También a Oli, por su dulzura, su alegría, su compañía y por nuestras salidas al parque.

A Leonel, por el incentivo, el amor, las salidas en bici, por todo lo recorrido y vivido.

Gracias a todos, por compartir conmigo estos años de trabajo y aprendizaje.

Sol

## INDICE

Abreviaturas.....	iv
Anglicismos.....	vi
Resumen.....	vii
1. Capítulo 1: Introducción .....	1
1.1. La radiación ultravioleta B .....	1
1.2. Efecto de la radiación UV-B sobre las plantas .....	1
1.2.1. Percepción de la radiación UV-B.....	2
1.2.2. Respuestas frente al daño en el ADN. Vías de señalización.....	3
1.3. La estructura y el remodelado de la cromatina en plantas.....	14
1.4. Control del desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Efectos de la radiación UV-B.....	18
1.4.1. Los factores de transcripción de la familia GRF y su regulación por el microARN 396.....	19
1.4.2. La vía del miR396 y los GRFs controlan el desarrollo de la hoja en respuesta a la radiación UV-B.....	22
2. Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	24
2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	24
2.2. Tratamientos con radiación UV-B.....	25
2.3. Purificación de ácidos nucleicos.....	26
2.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	27
2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	27
2.6. Tratamiento con ADNasa I.....	28
2.7. Retrotranscripción (RT).....	28
2.8. Amplificación de ácidos nucleicos.....	29
2.9. Análisis fenotípicos.....	33
2.10. Análisis de la raíz primaria.....	34
2.11. Análisis del daño al ADN.....	35
2.12. Determinación de los niveles de ploidía mediante la técnica de citometría de flujo.....	36
2.13. Análisis del grosor de la pared celular.....	36
2.14. Cuantificación de flavonoides y antocianinas.....	37
2.15. Determinación cualitativa del anión superóxido – Tinción con NBT.....	37
2.16. Análisis estadístico.....	37
3. Capítulo 3: Rol de los factores de transcripción E2F en las respuestas a la radiación UV-B en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Interacción con otras vías involucradas en el control del desarrollo.....	38
3.1. Objetivos.....	38
3.1.1. Objetivo general.....	38

3.1.2. Objetivos específicos.....	38
3.2. Rol del factor de transcripción E2Fc en las respuestas a la radiación UV-B.....	39
3.2.1. Introducción.....	39
3.2.2. Resultados.....	42
3.2.2.1. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan niveles alterados en la expresión del transcripto que codifica para E2Fc.....	42
3.2.2.2. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan expresión disminuida del microARN 396 ( <i>MIM396</i> ).....	68
3.2.2.3. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas transgénicas <i>MIM396xE2FcRNAi</i> y <i>E2FcRNAi x MIM396</i> .....	77
3.2.2.4. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas cuádruple mutantes en los factores de transcripción TCP2, TCP3, TCP4 y TCP10 ( <i>tcp2x3x4x10</i> ).....	85
3.3. Rol del factor de transcripción E2Fb en las respuestas a la radiación UV-B.....	89
3.3.1. Introducción.....	89
3.3.2. Resultados.....	91
3.3.2.1. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan niveles alterados en la expresión del transcripto que codifica para E2Fb.....	91
3.4. Análisis de la expresión de los factores de transcripción E2Fs en las plantas mutantes <i>uvr8</i> y <i>mpk3</i> .....	102
3.5. Discusión.....	104
4. Capítulo 4: Rol de las proteínas FAS1 y FAS2 en las respuestas a la radiación UV-B en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	108
4.1. Objetivos.....	108
4.1.1. Objetivo general.....	108
4.1.2. Objetivos específicos.....	108
4.2. Introducción.....	109
4.3. Resultados.....	112
4.3.1. Las plantas mutantes <i>fas1-4</i> y <i>fas2-4</i> acumulan menor cantidad de daño en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B.....	112
4.3.2. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las hojas de las plantas mutantes <i>fas1</i> y <i>fas2</i> de manera diferente a nivel celular que a las plantas salvajes Col-0.....	114
4.3.3. La radiación UV-B produce el engrosamiento de la pared celular y cambios en la expresión de las enzimas implicadas en su metabolismo en las plantas mutantes <i>fas</i> .....	119
4.3.4. Las plantas mutantes <i>fas</i> acumulan mayor cantidad de pigmentos fotoprotectores.....	123
4.3.5. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las raíces en las plantas mutantes <i>fas</i> .....	124

4.3.6. Las plantas mutantes <i>fas2-4</i> presentan alteraciones en la expresión de los genes de respuesta al daño en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B.....	129
4.4. Discusión.....	131
5. Capítulo 5: Conclusiones.....	135
6. Capítulo 6: Anexo.....	137
6.1. Resultados obtenidos con la línea transgénica <i>E2FcRNAixMIM396</i> .....	137
6.2. Resultados obtenidos con la línea mutante <i>e2fb-2</i> .....	142
6.3. Resultados obtenidos con la línea mutante <i>fas2-3</i> .....	145
7. Capítulo 7: Referencias bibliográficas.....	153

## ABREVIATURAS

6-4 PPs	6-4 fotoproductos pirimidina-pirimidona
aa	Aminoácido
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	Desoxirribonucleasa I
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ADN-T	Segmento de ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
Col-0	Columbia 0
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DPCs	Dímeros de pirimidina por formación de un anillo de ciclobutano
DSBs	Rupturas doble hebra (del inglés, Double Strand Breaks)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico
IOD	Densidad óptica integrada (del inglés, Integrated Optical Density)
miARN	microARN
miR396	microARN 396
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (del inglés, Nucleotide Excision Repair)
PBS	Buffer fosfato salino



PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)
RT	Reacción de retrotranscripción
TBE	Buffer Tris borato EDTA
TBS	Buffer Tris salino
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta

## ANGLICISMOS

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

Dot blot: técnica que emplea la hibridización de ADN genómico desnaturalizado con hidróxido de sodio a una membrana apropiada, para un posterior revelado con anticuerpos específicos, los cuales detectan lesiones en el ADN.

SLO: stem-loop-oligo, es un oligonucleótido que adopta una estructura de tallo y burbuja, lo que permite utilizarlo como cebador para la retrotranscripción de microARNs maduros.

## RESUMEN

La radiación UV-B es la forma más energética de luz solar que alcanza la superficie terrestre, y a la que las plantas se encuentran inevitablemente expuestas. Dosis elevadas de UV-B, como las que se perciben durante el verano, producen daño en diversas biomoléculas y afectan el crecimiento de las plantas.

En particular, la inhibición del crecimiento de las hojas se debe a que el UV-B afecta los procesos de proliferación y/o expansión celular, como consecuencia, en parte, del daño que produce en el ADN. En *Arabidopsis thaliana* existen diversas vías que controlan estos procesos, aunque la participación de la mayoría de ellas en las respuestas al UV-B, así como la presencia de una conexión entre las mismas, aún no han sido dilucidadas. Conjuntamente, el remodelado de la cromatina es un proceso fundamental en la respuesta al daño en el ADN. El complejo CAF-1, una chaperona de histonas de tipo H3/H4, participa en la reparación del daño al ADN, en los procesos de recombinación y en el control de la expresión de diversos genes. Si bien se ha descrito su participación en la respuesta al estrés causado por diferentes agentes genotóxicos, aún no se ha estudiado si interviene en las respuestas al UV-B.

En este trabajo de Tesis se demostró que los factores de transcripción E2Fb y E2Fc, pertenecientes a la vía del Retinoblastoma, participan de la regulación del crecimiento de *Arabidopsis* luego de la exposición al UV-B a través de mecanismos diferentes, aunque ambos regulan de manera antagónica la expresión de *E2Fe*, otro factor de transcripción cuya participación en la respuesta al UV-B ya ha sido dilucidada. Por un lado, E2Fc regula la expresión de genes de respuesta al daño en el ADN y actúa de manera epistática sobre el microARN 396, el cual también interviene en la regulación del crecimiento de las hojas bajo condiciones de iluminación con UV-B. Por otro lado, E2Fb contribuye, en parte, con las respuestas al UV-B mediadas por E2Fe, al regular el inicio del endociclo.

En lo que respecta a CAF-1, se determinó mediante la utilización de líneas de *Arabidopsis* deficientes en la actividad de este complejo, que cumple funciones diferentes en las hojas y en las raíces en respuesta a la radiación UV-B. Esto puede deberse a que la participación de CAF-1 en los mecanismos de respuesta a este tipo de estrés sea específica para cada tipo de tejido.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que existe una compleja red regulatoria para mantener el crecimiento de las plantas en función de las condiciones ambientales, y en particular frente a niveles incrementados de radiación UV-B.

# Capítulo 1

## Introducción



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. La radiación ultravioleta-B.**

La radiación solar es esencial para la vida en la tierra. Las plantas utilizan la luz solar para dirigir y regular procesos esenciales como la fotosíntesis (Ruban, 2014), el crecimiento y el desarrollo (Fankhauser y Chory, 1997), el ritmo circadiano y la floración (Hayama y Coupland, 2003; Srikanth y Schmid, 2011). Los componentes del espectro electromagnético que participan en estos procesos abarcan la luz visible, parte de la radiación ultravioleta (UV) e infrarroja. En particular, la radiación UV se divide por convención en tres regiones: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm). La radiación UV-A alcanza la superficie terrestre casi en su totalidad y constituye una importante señal fotomorfogénica en las plantas (Aggarwal y col., 2013), mientras que la radiación UV-C es potencialmente la más peligrosa, pero es filtrada completamente por la atmósfera. Por el contrario, sólo una parte de la radiación UV-B es absorbida por la capa de ozono (Sharma y col., 2017), por lo tanto, es la radiación más dañina proveniente del sol que alcanza la superficie terrestre. Altas intensidades de UV-B, como las que se perciben durante el verano, generan efectos perjudiciales sobre los seres vivos, principalmente sobre las plantas, debido a su naturaleza sésil (Ulm y Jenkins, 2015). Es por esto que las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de tolerancia y adaptación a la radiación UV-B (Britt, 1996; Kliebenstein y col., 2002; Casati y Walbot, 2004; Hase y col., 2006).

### **1.2. Efectos de la radiación UV-B sobre las plantas.**

Múltiples experimentos han sido realizados para caracterizar las respuestas de las plantas frente a la radiación UV-B, sin embargo, los resultados varían ampliamente dependiendo del tipo de tratamiento realizado, es decir, según la longitud de onda utilizada, la intensidad y la duración de la exposición (Jenkins, 2009). En general, la exposición prolongada a bajas dosis de UV-B provoca respuestas de adaptación, no observándose síntomas de estrés en las plantas. Algunas de ellas son la acumulación de compuestos fenólicos que absorben la radiación UV-B y actúan como barrera al paso de dicha radiación al interior de los tejidos (Bornman y col., 1997), así como el aumento en la acumulación de ceras cuticulares (Steinmüller y Tevini, 1985; Shepherd y Griffiths, 2006; Ruban, 2014).

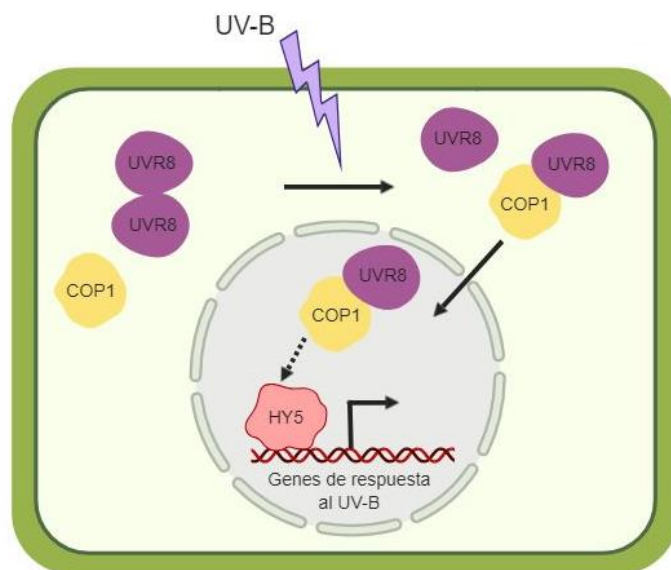
Por otro lado, tratamientos con alta intensidad de UV-B inducen fundamentalmente respuestas de estrés, dado que provocan daño directo a las biomoléculas como los ribosomas, los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas (Kramer y col., 1991; Britt, 1996; Gerhardt y col., 1999; Casati y Walbot, 2004). En particular, la absorción de UV-B por el ADN induce la formación de enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes, dando lugar a la formación de dímeros de pirimidina por formación de anillos de ciclobutano (DPCs) y a 6-4 fotoproductos pirimidina-pirimidona (6-4 PPs) (Friedberg y col., 1995). Estas lesiones interrumpen los procesos normales de replicación y transcripción del ADN, lo que afecta al

crecimiento de las plantas e induce mutagénesis durante la replicación si las lesiones no son reparadas (Britt, 1996). Además, la elevada radiación UV-B induce un amplio rango de respuestas fisiológicas y cambios morfológicos. En la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* se ha reportado la disminución en el diámetro de la roseta y en la altura de la inflorescencia, así como un incremento en la densidad de los tricomas, en el número de brotes florales y retraso en el tiempo de floración (Jansen y col., 1998; Hectors y col., 2007; Jenkins, 2009; Dotto y col., 2018). Es por esto que las plantas han desarrollado mecanismos para filtrar o absorber el UV-B para protegerse del daño, y también poseen sistemas muy eficientes de reparación del daño al ADN para conservar la integridad del genoma, el crecimiento de la planta y la viabilidad de las semillas (Hays, 2002; Bray y West, 2005; Kimura y Sakaguchi, 2006).

#### 1.2.1. Percepción de la radiación UV-B.

Varias moléculas fotorreceptoras han evolucionado en las plantas para permitir una adaptación óptima a la luz, y el rango de acción de éstas va desde el UV-B hasta el infrarrojo. Hasta el momento sólo se ha identificado y caracterizado un único fotorreceptor capaz de detectar radiación UV-B, denominado UVR8 (del inglés, UV Resistance Locus 8; Heijde y Ulm, 2012). UVR8 es una proteína cuyos niveles no varían por la influencia de la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana*, aunque su distribución dentro de la célula sí se modifica (Kaiserli y Jenkins, 2007). En ausencia de UV-B, cuando el fotorreceptor se encuentra en el estado inactivo, es un homodímero que se encuentra en el citoplasma; mientras que en presencia de UV-B se monomeriza rápidamente dirigiéndose hacia el núcleo. Los residuos de triptófano ubicados en la superficie de UVR8, donde interactúan sus monómeros, son claves en el proceso y actúan como cromóforos (Rizzini y col., 2011). Una vez en el núcleo, UVR8 puede asociarse con la proteína E3 ubiquitin-ligasa COP1 (del inglés, Constitutive Photomorphogenesis 1), un regulador de la expresión de diversos genes modulados por luz. Ambas proteínas son requeridas para la activación de la expresión del gen *HY5*, el cuál actúa como un activador transcripcional de genes importantes para las respuestas al UV-B y tiene un rol vital en la protección contra esta radiación y en el mantenimiento de la fotosíntesis (Brown y col., 2005). Además de ser regulada a nivel transcripcional, la proteína *HY5* se estabiliza en presencia de la radiación UV-B. Esto se debe a que en ausencia de UV-B se produce su ubiquitinación por COP1 y su posterior degradación por el proteosoma, lo que indica que parte del mecanismo de señalización por UV-B implica la inactivación de COP1 (Figura 1.1; Favory y col., 2009; Heijde y Ulm, 2013).

Las respuestas reguladas por UVR8 son, en general, respuestas fotomorfogénicas y de aclimatación, las cuales suelen inducirse luego de la exposición a dosis de baja intensidad de UV-B (Favory y col., 2009; Rizzini y col., 2011; Davey y col., 2012; Heijde y Ulm, 2013).



**Figura 1.1.** Esquema que representa la vía de señalización mediada por UVR8, a través de la cual se regula la expresión de múltiples genes implicados en los procesos de adaptación a la radiación UV-B. Adaptado de Liang y colaboradores (2018).

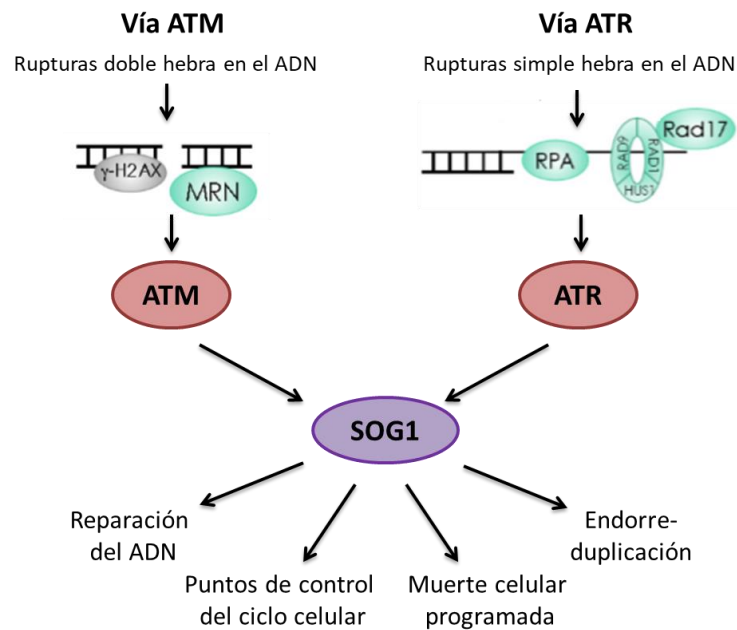
#### 1.2.2. Respuestas frente al daño en el ADN. Vías de señalización.

Numerosas respuestas inducidas por la radiación UV-B son independientes de UVR8, en particular aquellas en las cuales el UV-B resulta un agente ambiental causante de estrés. Entre los múltiples efectos negativos que causa en los organismos, el daño en el ADN es el más relevante. En contraste con los animales, las plantas son organismos sésiles, por lo que no pueden cambiar su ubicación cuando se encuentran expuestas a un ambiente desfavorable. Además, debido a que requieren de la luz solar para llevar a cabo la fotosíntesis, sus cloroplastos generan continuamente especies reactivas del oxígeno (EROs), por lo que las plantas están constantemente expuestas al daño en el ADN (Triantaphylides y Havaux, 2009). También, y de manera opuesta con lo que sucede en animales, el desarrollo de las plantas es un proceso mayoritariamente post-embriionario, que es llevado a cabo por los meristemas, en donde las células se dividen a lo largo de toda la vida del organismo.

Debido a que el genoma contiene toda la información necesaria que se requiere para el desarrollo y crecimiento de un individuo, es de suma importancia protegerlo, y es por esto que, como consecuencia del daño en el ADN, las células eucariotas activan una red de vías de respuesta llamada comúnmente “Respuesta frente al daño en el ADN” (DDR por sus siglas en inglés) (Ciccía y Elledge; 2010). Este sistema incluye e interrelaciona vías de señalización que conducen a las células hacia la reparación del ADN dañado, el arresto del ciclo celular para permitir que esta reparación ocurra evitando la propagación de mutaciones, y en última instancia, a la muerte celular, estando algunas de estas vías conservadas entre animales y plantas (Yoshiyama y col., 2013b).

En *A. thaliana* existen dos proteínas quinasas que forman parte del sistema DDR y que son reclutadas cuando los complejos formados por proteínas sensoras reconocen distintos tipos de daño en el ADN. Una de ellas es ATM (del inglés, Ataxia Telangiectasia Mutated), que es activada mayoritariamente cuando se producen rupturas doble hebra en el ADN, y actúa en los puntos de control que se encuentran en las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular; mientras que ATR (del inglés, ATM and RAD3–Related) es la proteína quinasa que mayoritariamente responde a rupturas simple hebra en el ADN y a daños en el ADN que producen defectos en la replicación, y actúa en el punto de control G1/S y durante la fase S (Culligan y Britt, 2008; Flynn y Zou, 2011). Una de las respuestas inmediatas frente a la ruptura doble hebra en el ADN es la fosforilación de la variante de histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), proceso que es dependiente de ambas proteínas quinasas y que conlleva al reclutamiento de RBR (del inglés, Retinoblastoma tumor suppressor Related), proteína involucrada en el mantenimiento de la estabilidad del genoma junto con E2Fa, un factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de los genes del sistema DDR (Horvath y col., 2017). Además, tanto ATM como ATR conducen a la activación del factor de transcripción SOG1 (del inglés, Suppressor of Gamma Response 1), al regular su actividad por fosforilación. SOG1 está involucrado en muchas respuestas al estrés causado por agentes genotóxicos, entre las que se encuentran la activación de respuestas al daño en el ADN, el arresto del ciclo celular, la endoreduplicación y la muerte celular programada (Figura 1.2), funciones similares a las que controla p53 en animales (Yoshiyama y col., 2013a; Yoshiyama y col., 2013b; Ogita y col., 2018). Además, SOG1 juega un rol fundamental en el control del crecimiento de las raíces. En *Arabidopsis*, plantas mutantes *atm* y *atr* contienen un gran número de células que han iniciado el programa de muerte celular en el meristema radicular, lo que indica que estas dos proteínas son fundamentales para desencadenar esta respuesta, que se da como consecuencia de la incapacidad de las células para reparar el ADN dañado. Por el contrario, las plantas mutantes *sog-1* muestran un fenotipo opuesto al de las mutantes *atm* y *atr*, lo que revela que SOG1 también tiene un rol en la muerte de las células del meristema radicular (Culligan y col., 2004; Yoshiyama y col., 2009; Furukawa y col., 2010).

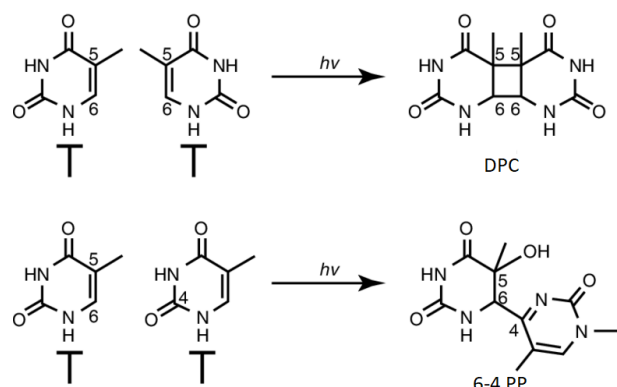




**Figura 1.2.** Respuestas frente al daño en el ADN en *A. thaliana*. Los complejos que detectan el ADN dañado se muestran en verde. Las rupturas doble hebra son detectadas por el complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1), mientras que las rupturas simple hebra son detectadas por RPA (del inglés, Replication Protein A). El complejo RAD9/RAD1/HUS1 también detecta este tipo de daño y forma una abrazadera, siendo Rad17 el encargado de guiar su carga en el sitio del daño. Todos los sensores fueron descritos en mamíferos, encontrándose los homólogos correspondientes en *A. thaliana*. Frente a una situación de daño en el ADN las proteínas quinasas ATM y/o ATR fosforilan al factor de transcripción SOG1. De esta manera se regulan múltiples vías de respuesta. Adaptado de Yoshiyama y colaboradores (2013b).

#### 1.2.2.1. Vías de reparación del daño en el ADN.

La radiación UV-B es un agente causal de daño directo en el ADN, siendo las lesiones predominantes los dímeros de pirimidina por formación de anillo de ciclobutano (DPCs) y los (6-4) fotoproductos pirimidina-pirimidona (6-4 PPs) (Figura 1.3). Estas lesiones representan el 75% y el 25% del daño, respectivamente, siendo las secuencias TT y TC más fotorreactivas que las secuencias CT y CC (Rastogi y col., 2010). Si estas lesiones no son reparadas pueden causar distorsiones en la estructura del ADN, afectando procesos esenciales como la replicación y la transcripción, y llevando, en última instancia, a disrupciones en el metabolismo celular y a la mutagénesis (Britt, 1996; Rastogi y col., 2010). Por ello, la reparación del daño en el ADN es crucial para todos los organismos vivos. En particular, las plantas poseen dos mecanismos principales para reparar los fotoproductos, uno de ellos es la fotorreactivación y el otro es el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés). Ambos se describen a continuación.

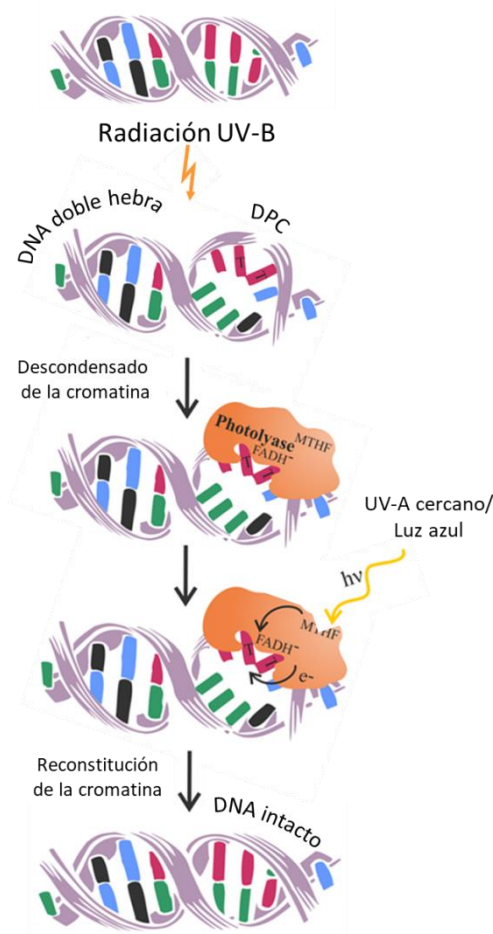


**Figura 1.3.** Formación de dímeros de pirimidina. Estructuras de dímeros de pirimidina por formación de anillo de ciclobutano (DPC) y (6-4) fotoproductos pirimidina- pirimidona (6-4 PP), que se forman por acción de la radiación UV-B para dos timinas adyacentes. Adaptado de Oak y colaboradores (2018).

La fotorreactivación enzimática es llevada a cabo por las enzimas fotoliasas, que se unen directamente a los dímeros de pirimidina y provocan su monomerización mediante una reacción redox cíclica, utilizando para ello la energía de la luz (Sancar, 2016). Estas enzimas contienen dos cofactores: uno catalítico y otro responsable de la captura de luz, y pueden ser del tipo folato o flavina (Britt, 1996; Jansen y col., 1998; Rastogi y col., 2010). En la Figura 1.4 se representa el mecanismo general de acción de las fotoliasas. En primer lugar, la enzima se une a los dímeros de pirimidina en el ADN doble hebra de manera independiente de la luz. Con el fin de obtener energía para corregir la lesión, las fotoliasas absorben un fotón proveniente de la luz azul o del UV-A cercano (Brettel y Byrdin, 2010). La absorción de este fotón permite la transferencia de un electrón desde el cromóforo de la fotoliasa hacia la lesión, y de esta manera escindir el enlace covalente del dímero. Finalmente, el electrón es devuelto al cofactor para restablecer el estado catalíticamente activo del mismo (Thiagarajan y col., 2011). El mecanismo químico exacto de las reacciones de fotorreparación difiere entre los dos clases de fotoliasas que reparan los distintos tipos de dímeros de pirimidina; sin embargo, en las dos reacciones el producto final es la monomerización de las bases, dejando la secuencia de nucleótidos sin cambios (Manova y Gruszka, 2015).

Los genes *UVR2* (también denominado *PHR1*) y *UVR3* de *A. thaliana* codifican para las fotoliasas encargadas de reparar los DPCs y los 6-4 PPs, respectivamente. Las plantas mutantes *uvr2* y *uvr3* son incapaces de remover estas lesiones del ADN, y por lo tanto, son más sensibles a la radiación UV-B que las plantas salvajes (Jiang y col., 1997; Landry y col., 1997). Además, tanto la luz blanca como la radiación UV-B inducen la expresión de la fotoliasa de DPCs en *Arabidopsis*, a diferencia de lo que ocurre para la fotoliasa que repara los 6-4 PPs, dado que tiene expresión constitutiva y no es regulada por luz (Waterworth, 2002). También, Li y colaboradores (2015) reportaron que la expresión de la

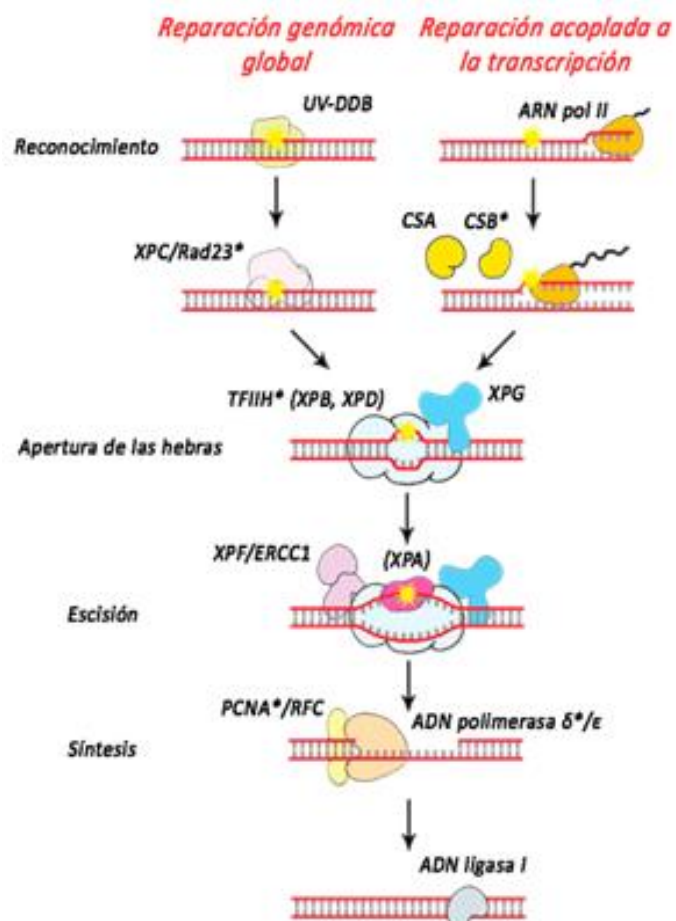
fotoliasa de DPCs está regulada por múltiples vías de señalización, incluyendo las vías dependientes e independientes de UVR8.



**Figura 1.4.** Representación esquemática del mecanismo de fotorreactivación utilizado por las plantas para reparar los dímeros de pirimidina inducidos por luz UV-B en el ADN doble hebra. El mecanismo que podría operar dentro de las regiones abiertas de ADN generadas durante los procesos de transcripción, replicación y reparación para reparar los DPCs y 6-4 PPs aún no se encuentra completamente dilucidado. Adaptado de Manova y Gruszka. (2015).

Por otro lado, los DPCs y los 6-4 PPs, al generar distorsiones pronunciadas en la doble hebra, también son reconocidos por el mecanismo de reparación NER, que no utiliza la energía de la luz. Este mecanismo se encuentra conservado entre los distintos organismos procariotas y eucariotas, siendo el sistema de *Arabidopsis* similar al de humanos (Kunz y col., 2005). Existen dos vías diferentes de reparación dentro del sistema NER: la vía de Reparación Genómica Global y la vía de Reparación Acoplada a la Transcripción. La primera es una ruta de reparación completa del genoma, influenciada por la estructura y las proteínas unidas al ADN, mientras que la segunda se especializa en acelerar la eliminación de las lesiones que bloquean la transcripción de los genes que presentan altos niveles de expresión (Hanawalt, 2002). Las dos vías utilizan factores específicos, encontrándose la mayor diferencia en el modo de reconocer el daño, sin embargo, durante los pasos siguientes ambos sistemas

operan de manera similar (Manova y Gruszka, 2015). De esta manera, una vez que el sistema reconoce el fotoproducto, cataliza una doble incisión en la hebra dañada, una a cada lado de la lesión, y a continuación ocurre la remoción de dicho fragmento de oligonucleótidos. Luego, se produce la síntesis de ADN por acción de una ADN polimerasa para completar la hebra, y finalmente, la ligación que es llevada a cabo por una ADN ligasa (Figura 1.5; Kimura y Sakaguchi, 2006; Canturk y col., 2016). Los genes de *Arabidopsis* involucrados en la reparación del daño en el ADN por UV-B fueron identificados utilizando mutantes sensibles a esta radiación. Las plantas mutantes *uvr1*, *uvr5*, *uvr7* (del inglés, UV repair defective) y *uvh1* (del inglés, Ultraviolet Hypersensitive) son deficientes en la reparación por escisión de nucleótidos (Jiang y col., 1997; Britt y Fiscus, 2003). El gen *UVH1* codifica para una proteína que posee actividad endonucleasa y es homóloga a RAD1 de *Saccharomyces cerevisiae* y XPF de humanos (Liu y col., 2000). Por otro lado, la proteína UVR7 es una ADN endonucleasa, homóloga a ERCC1 de humanos. Las plantas mutantes en el gen que codifica para esta proteína son sensibles a la radiación y al UV-B (Hefner y col., 2003). UVH6 es una 5'-3'ADN helicasa, que presenta una secuencia similar a XPD de humanos y a RAD53 de levaduras. La proteína UVH6 juega un papel importante en la reparación del ADN, ya que abriría las hebras de ADN alrededor del daño. Además, el gen *UVH6* se requiere para la resistencia a la radiación UV-B y es esencial en *Arabidopsis* (Liu y col., 2003). Por último, la proteína UVH3 de *Arabidopsis* codifica para una endonucleasa y es homóloga a XPG de humanos.



**Figura 1.5.** Esquema que representa de manera sencilla el mecanismo del sistema NER en humanos. Se distinguen las dos formas en las que puede darse este mecanismo: el sistema de reparación genómico global o el sistema de reparación acoplado a la transcripción. Adaptado de Kimura y Sakaguchi (2006).

Por otro lado, cuando el daño en el ADN persiste y no puede ser reparado correctamente, existen mecanismos que permiten la replicación de los cromosomas a pesar de las lesiones. Estos mecanismos se denominan “vías de tolerancia al daño”, y en plantas existen al menos dos: la síntesis

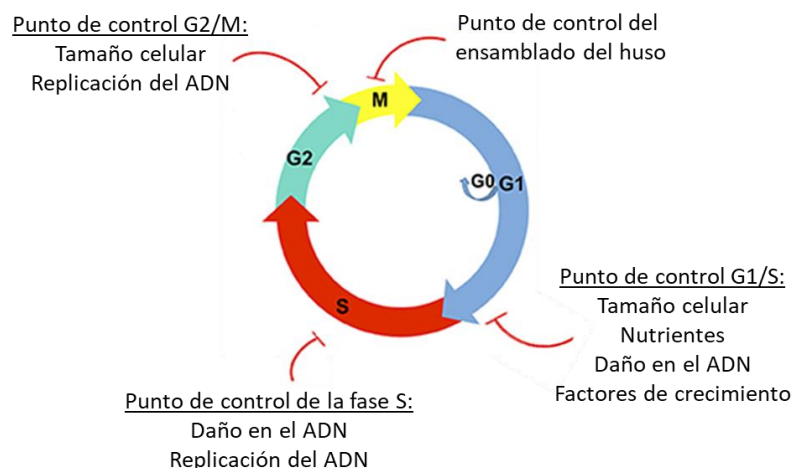
de ADN translesión (TLS, por sus siglas en inglés) y la reparación por recombinación (Britt, 1996; Kimura y Sakaguchi, 2006).

#### 1.2.2.2. El control del ciclo celular.

En plantas, como en otros eucariotas, el ciclo celular es un proceso ubicuo y complejo que involucra la replicación del ADN, la segregación de los cromosomas y la división celular. El ciclo celular mitótico consiste en cuatro fases: en la fase G1 ocurre el crecimiento de la célula; en la fase S se lleva a cabo la replicación del ADN; en la fase G2 las células se preparan para dividirse, y en la fase M se da la mitosis, culminando con la división celular. Las células también pueden salir del ciclo celular y entrar en un estado de quiescencia, denominado fase G0 (Murray y col., 2001; Rossi y Varotto 2002; El-Aouar Filho y col., 2017).

La progresión a través del ciclo celular está regulada por la actividad de complejos constituidos por Serina/Treonina Quinasas, denominadas Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés) y Ciclinas (CYC, por su abreviatura en inglés). En plantas, existen dos tipos de CDKs principales, que se clasifican como tipo A (CDKA) o tipo B (CDKB), y presentan actividad máxima en diferentes puntos del ciclo celular. La actividad y la especificidad por el sustrato de las CDKs está determinado por su asociación con Ciclinas (De Veylder y col., 2007). Los complejos CDK/CYC fosforilan una gran cantidad de sustratos, haciendo que de esta manera ocurra la transición a través de las diferentes fases. La subunidad catalítica de la CDK es la responsable de reconocer el motivo blanco presente en el sustrato para su fosforilación, mientras que la CYC discrimina entre las distintas proteínas sustrato (Inzé y De Veylder, 2006; Gutiérrez 2009).

La formación y la actividad de los complejos CDK-CYC son reguladas a través de su síntesis y degradación durante el ciclo celular, así como también por el estado de fosforilación de las CDKs, llevado a cabo por Quinasas activadoras de CDKs, por la unión a pequeñas proteínas inhibidoras de CDKs (CKI, por sus siglas en inglés) o por la proteólisis ejecutada por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma E3 ubiquitin-ligasa (APC/C, por su abreviatura en inglés) (Wang y col., 1998; Menges y col., 2005; Heyman y De Veylder, 2012; Lim y Kaldis, 2013). La combinación de estas vías junto con los puntos de control del ciclo celular dirige la progresión a través del mismo en respuesta a estímulos ambientales y a condiciones intracelulares. Durante las transiciones G1/S y G2/M, así como en las fases S y M, operan importantes puntos de control para asegurar que cada célula hija reciba el material hereditario correctamente (Figura 1.6). La activación de estos puntos de control puede llevar a la supervivencia de la célula o a la muerte celular (El-Aouar Filho y col., 2017).



**Figura 1.6.** Representación esquemática del ciclo celular eucariota y su regulación. El ciclo celular consiste en dos intervalos G1 y G2, la fase S y la fase M. Durante las transiciones G1/S y G2/M operan importantes puntos de control, así como también dentro de las fases S y M, con el objetivo de que las células hijas reciban el material hereditario correctamente. Además, las células pueden salir del ciclo celular y entrar en un estado de quiescencia denominado fase G0. Adaptada de El-Aouar Filho y colaboradores (2017).

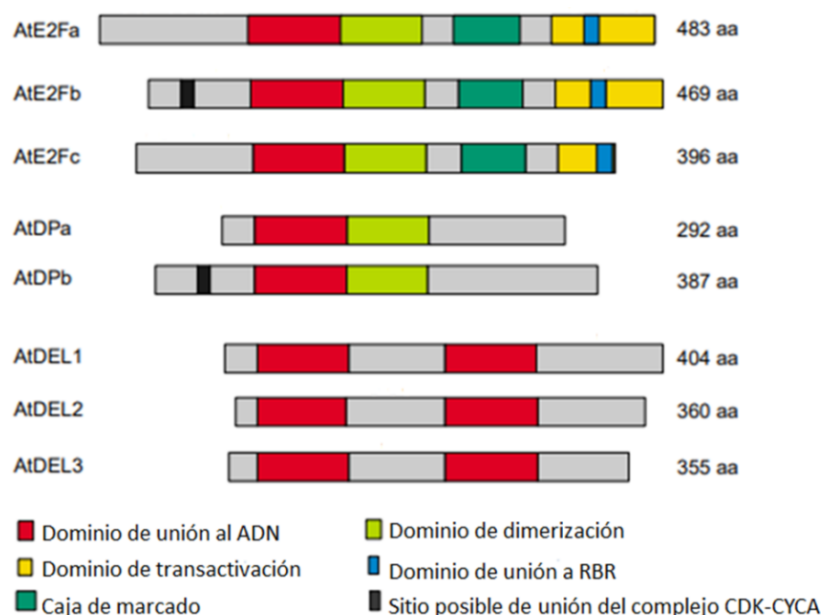
#### 1.2.2.2.1. La vía del Retinoblastoma en plantas.

El comienzo de un nuevo ciclo celular se da en respuesta a hormonas y factores de crecimiento que impulsan a la célula a atravesar la fase G1, induciendo la expresión y/o activación de las CDKA mediante la asociación con Ciclinas tipo D (CYCDs) (Gutiérrez, 2002; Inzé y De Veylder, 2006). El complejo CDKA/CYCD regula mediante fosforilación la actividad de RBR, una de las proteínas pertenecientes a la Vía del Retinoblastoma. Esta vía es crucial para regular la progresión a través del ciclo celular y es el principal mecanismo por el que las células regulan la transición entre las fases G1 y S, y activan la expresión de genes propios de la fase S, entre los que se encuentran los requeridos para la duplicación del genoma. Las proteínas que conforman esta vía se encuentran conservadas en la mayoría de los eucariotas, incluyendo plantas y animales (Weinberg, 1995; Shen, 2002; Menges y col., 2005; van den Heuvel y Dyson, 2008; Costas y col., 2011).

En *Arabidopsis*, la vía del Retinoblastoma está constituida por una proteína RBR, seis factores de transcripción de la familia E2F y dos proteínas de dimerización (DP, por sus siglas en inglés) (De Veylder y col., 2002; Mariconti y col., 2002; Vandepoele y col., 2002). Las proteínas E2F pueden clasificarse en dos subgrupos dependiendo de su estructura: E2Fa, b y c pertenecen al subgrupo “típicos” debido a que poseen un dominio de unión al ADN y otro de dimerización, por lo que necesitan formar heterodímeros con DPa o DPb para poder unirse al ADN de manera fuerte y específica. Por otro lado, E2Fd (DEL2), E2Fe (DEL1) y E2Ff (DEL3) se denominan “atípicos” ya que han perdido el dominio de dimerización y poseen duplicado su sitio de unión al ADN, por lo tanto se unen al mismo

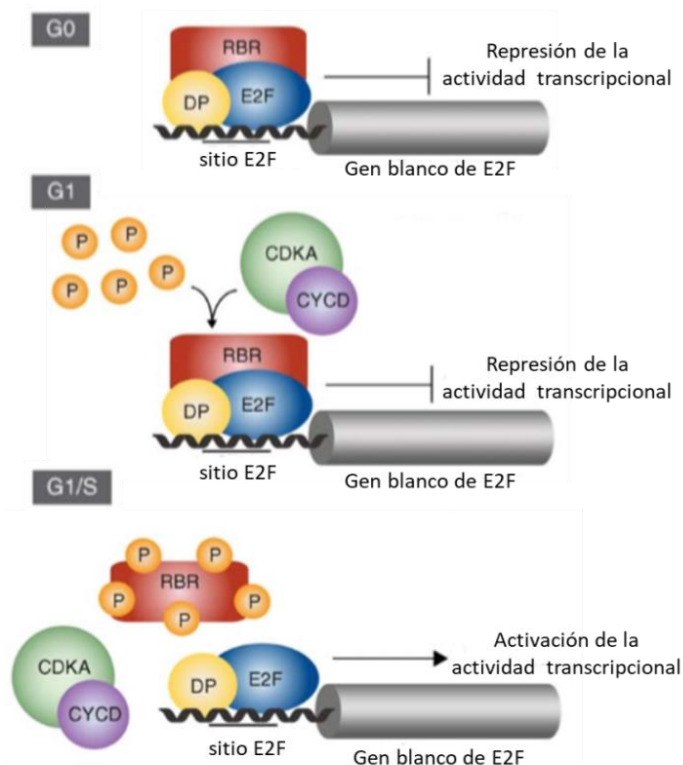
independientemente de las proteínas DP (Figura 1.7; Kosugi y Ohashi, 2002; Mariconti y col., 2002; Lammens y col., 2009).

Durante la fase G0 y el comienzo de la fase G1, en ausencia de un complejo CDKA-CYCD activo, la proteína RBR recluta factores remodeladores de la cromatina e inhibe al complejo transcripcional E2F/DP. Este se encuentra interaccionando con elementos de unión a factores de transcripción E2F en *cis* presentes en los promotores de los genes requeridos para el ingreso y la progresión a través de la fase S, por lo que la expresión de los mismos está reprimida (De Veylder y col., 2002; Uemukai y col., 2005; Zhao y col., 2012). Durante la fase G1 tardía, RBR es hiperfosforilado por los complejos CDKA-CYCD y se disocia del complejo E2F/DP, desencadenando la transición G1/S. De esta manera, el heterodímero E2F/DP puede regular la transcripción de sus genes blancos, involucrados en el control del ciclo celular, en la síntesis y en la replicación del ADN, en el ensamblado de la cromatina, y en la transición hacia el endociclo, entre otros (Figura 1.8; Shen, 2002; Berckmans y De Veylder, 2009).



**Figura 1.7.** Organización estructural de las proteínas de la familia E2F de Arabidopsis. En los rectángulos que representan las secuencias aminoacídicas de las proteínas E2F y DP se distinguen los dominios de unión al ADN, de dimerización, de transactivación y de unión a RBR, junto con la caja de marcado para su proteólisis y sitios potenciales de unión de complejos CDK-CYCA. Adaptado de Shen (2002).



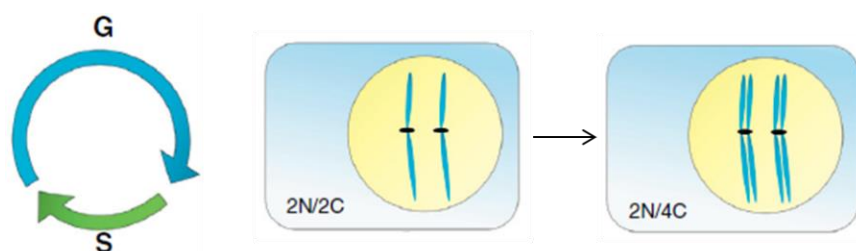


**Figura 1.8.** Modelo del mecanismo de regulación transcripcional llevado a cabo por los factores de transcripción E2F. En la fase G0, los genes específicos de la fase S no son transcritos debido al efecto inhibitorio que ejerce la proteína RBR sobre el heterodímero E2F/DP. Cuando las células se comprometen a dividirse, se sintetizan CYCDs en G1 y forman complejos activos con las proteínas CDKA, específicas para la transición de fases G1/S. Este complejo activo fosforila a la proteína RBR, liberando el complejo E2F/DP. A continuación, dicho heterodímero regulará la expresión de genes de la fase S, entre muchos otros. Adaptado de Berckmans y De Veylder (2009).

### 1.2.2.3. El endociclo.

A medida que las células salen del ciclo celular mitótico y dejan las regiones meristemáticas de las raíces, los ápices y los primordios foliares, comienzan el proceso de diferenciación. Durante el mismo, las células optan por un ciclo celular alternativo denominado endociclo, en el que la mitosis y la citocinesis son omitidas pero la replicación del ADN continúa, lo que resulta en un incremento en el nivel de ploidía celular (Figura 1.9; Lammens y col., 2008; Lee y col., 2009; Breuer y col., 2014). Numerosas funciones han sido atribuidas al endociclo en plantas de *Arabidopsis*, entre las que se encuentran el mantenimiento de la especificación celular, la expansión y la morfogénesis celular, y también actuar como una forma adaptativa de crecimiento frente a condiciones ambientales hostiles (De Veylder y col., 2011; Rymen y Sugimoto, 2012).

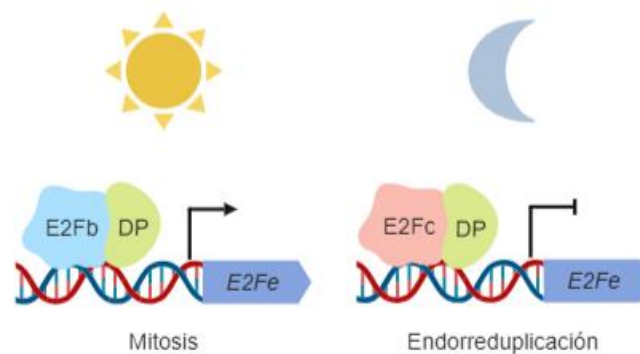




**Figura 1.9.** El endociclo en plantas. La salida del ciclo celular mitótico resulta en el ingreso al endociclo, en donde las células duplican su contenido de ADN (C) y forman cromosomas politénicos, representados con la letra N. Adaptado de Breuer y colaboradores (2014).

En *Arabidopsis*, múltiples proteínas están involucradas en la regulación del endociclo, entre las que se encuentran algunos de los factores de transcripción E2F. Magyar y colaboradores (2012) han demostrado que el complejo RBR-E2Fa reprime la expresión de los genes *CCS52A1* y *CCS52A2* en las células en proliferación activa que se encuentran en los meristemas, evitando de esta manera la transición del ciclo celular mitótico al endociclo. Estos genes codifican para proteínas activadoras del complejo E3 ubiquitin-ligasa APC/C, encargado de la degradación de las CYCs, que es necesario para el ingreso al endociclo. A su vez, también se ha demostrado que E2Fe (DEL1) reprime directamente la expresión de *CCS52A2* tanto en las raíces como en los ápices y que, mientras su expresión ectópica retrasa la salida del ciclo celular mitótico, su pérdida acelera la transición hacia el endociclo (Vlieghe y col., 2005; Lammens y col., 2008). Además, la expresión de *E2Fe* se encuentra modulada por la luz y regulada antagónicamente por E2Fb y E2Fc. En presencia de luz, E2Fb se une a un sitio consenso ubicado en el promotor de *E2Fe* y activa su expresión, manteniendo de esta manera la proliferación celular y evitando la endorreduplicación. Contrariamente, durante períodos de oscuridad, E2Fb es degradado proteolíticamente, lo que permite la unión de E2Fc al mismo elemento en *cis*, reprimiendo la expresión de *E2Fe* y promoviendo el inicio del endociclo (Figura 1.10; Berckmans y col., 2011).

Por otro lado, Radziejwoski y colaboradores (2011) han demostrado que E2Fe reprime la expresión del gen *UVR2/PHR1*, que codifica para la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs. Bajo condiciones de iluminación con luz UV-B, las plantas mutantes en *E2Fe* reparan su ADN de manera más eficiente que las plantas salvajes, mientras que aquellas que sobre-expresan este factor de transcripción son más sensibles a este tipo de radiación. Además, el hecho de reparar el ADN más eficientemente permite que las mutantes ingresen al endociclo más rápidamente y muestren menor inhibición en el crecimiento de las hojas con respecto a las plantas salvajes. Es por esto que se ha propuesto que la endorreduplicación sería un mecanismo que permitiría a las plantas protegerse contra la radiación UV-B (Hase y col., 2006), manteniendo el crecimiento de los tejidos por expansión celular bajo condiciones que previenen la proliferación celular (Barow y Meister, 2003), cumpliendo E2Fe un rol fundamental en este tipo de respuestas.



**Figura 1.10.** Modelo que representa la regulación del endociclo por luz. En presencia de luz, E2Fb activa la expresión de *E2Fe*, previniendo que las células entren en el programa de endorreduplicación. Bajo condiciones de oscuridad, E2Fc se une al promotor de *E2Fe* reprimiendo su expresión y permitiendo que las células ingresen al endociclo.

#### 1.2.2.4. La muerte celular programada.

El daño en el ADN ocurre frecuentemente en las células de los organismos vivos, principalmente en aquellas que fueron expuestas a elevadas dosis de radiación UV-B (Britt, 1996). Es por esto que existe una compleja red de respuestas frente al daño en el ADN como se describe en el comienzo del inciso 1.2.2., que incluye ejecutar el programa de muerte celular si el daño en el ADN no pudo ser reparado adecuadamente (d'Adda di Fagagna, 2008; Falcone Ferreyra y col., 2016).

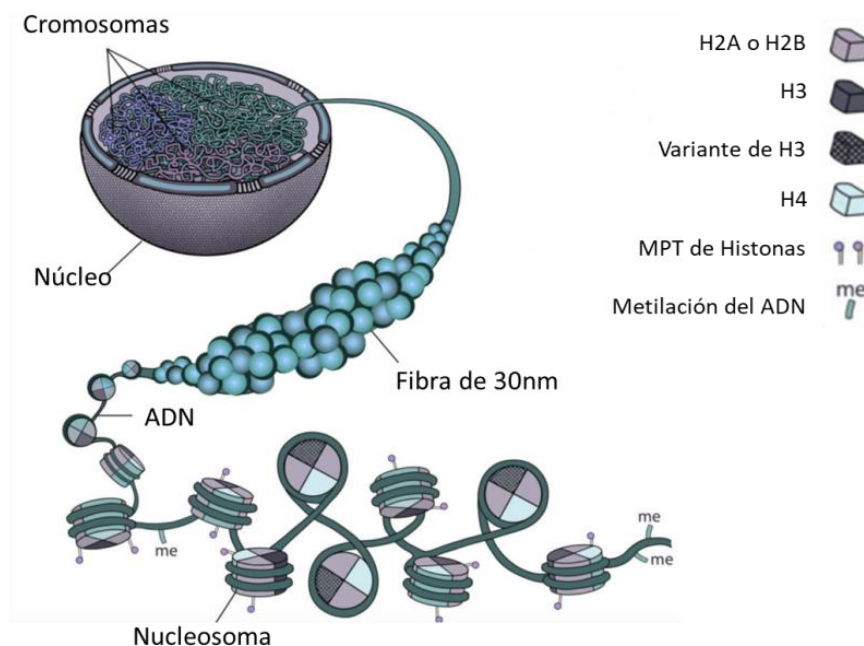
La muerte celular programada (MCP) se define como una secuencia de eventos que llevan a la destrucción controlada y organizada de una célula, siendo un componente fundamental en los procesos de desarrollo y en los mecanismos de defensa (Lockshin y Zakeri, 2004a, 2004b; Reape y col., 2008). En mamíferos, los mecanismos que conducen a la MCP han sido ampliamente estudiados, mientras que en plantas este campo de estudio es relativamente reciente. En *A. thaliana* se ha demostrado que el daño en el ADN causado por UV-B induce la muerte celular de las células madres presentes en los meristemas apical y radicular de manera dependiente de ATM y/o ATR (Fulcher y Sablowski., 2009; González Besteiro y Ulm, 2013; Yoshiyama y col., 2013a). Particularmente en las raíces, ambas proteínas quinasas participan en la MCP activando al factor de transcripción SOG1, el cual a su vez regula efectores de la muerte celular en respuesta a la radiación UV-B (Furukawa y col., 2010).

### 1.3. **La estructura y el remodelado de la cromatina en plantas.**

El ADN de los organismos eucariotas está empaquetado en el núcleo celular asociado a proteínas formando la cromatina. La unidad básica repetitiva de la cromatina es el nucleosoma, el cual está constituido por un complejo octamérico formado por proteínas básicas denominadas histonas, en el cual se enrollan 146 pb del ADN. Cada nucleosoma está conectado al siguiente por un fragmento de ADN espaciador de aproximadamente 160-240 pb. Las histonas han sido estructuralmente conservadas a lo largo de la evolución y llevan a cabo dos funciones esenciales; por un lado, empaquetar las moléculas de ADN dentro de los límites del núcleo eucariota para proteger al genoma

del daño físico, y por otro lado, permitir que el ADN se encuentre accesible para poder expresar los genes en el momento adecuado (Rosa y Shaw, 2013). La partícula octamérica está formada por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (McGinty y Tan, 2014). Además, cerca de 20 pb del ADN espaciador se asocian con una única “histona de unión” H1 o H5 (Rosa y Shaw, 2013; McGinty y Tan, 2014). Las histonas que conforman el octámero son muy conservadas y poseen una alta proporción de aminoácidos básicos que le confieren una carga neta positiva a pH fisiológico (McGinty y Tan, 2014). Además, tienen extensiones N y C terminales que se despliegan desde el nucleosoma y albergan una gran densidad y diversidad de modificaciones pos-traduccionales que contribuyen con la unión del ADN y al plegado de orden superior, y/o a la oligomerización de la cromatina a través de la unión a nucleosomas adyacentes (McGinty y Tan, 2014).

La cromatina sigue un orden jerárquico de estructuración que puede dividirse en tres niveles: primario, secundario y terciario. La estructura primaria comprende el arreglo lineal de nucleosomas. El siguiente nivel se define por la compactación local de un arreglo de nucleosomas en una fibra de 30 nm de diámetro. En el tercer nivel se describen los contactos entre hebras de los elementos estructurales secundarios (McGinty y Tan, 2014). El estado de estructuración de la cromatina influye en procesos importantes como la expresión de los genes, la replicación, la recombinación y la reparación del ADN. En estados más condensados (heterocromatina), la accesibilidad de las proteínas requeridas para estos procesos está limitada, mientras que no lo está en la cromatina en una forma más laxa (eucromatina) (Figura 1.11).



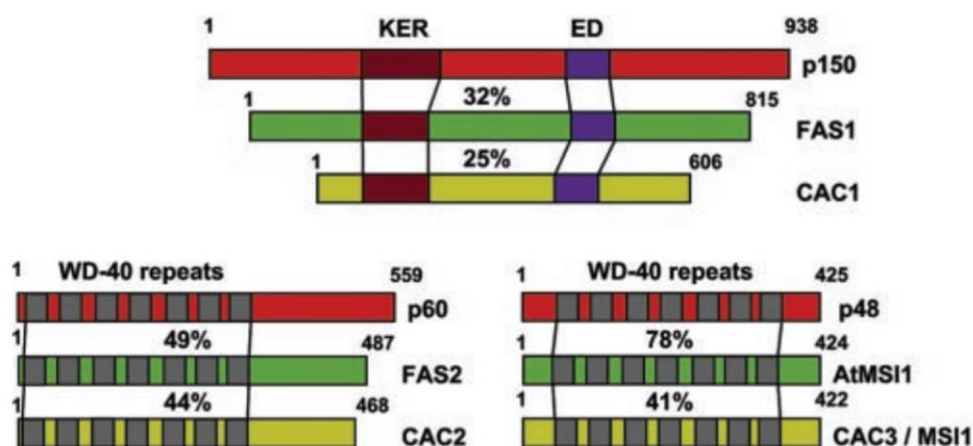
**Figura 1.11.** Esquema representativo de la organización de la cromatina. MPT: modificaciones pos-traduccionales de las histonas. Adaptado de Rosa y Shaw (2013).

Numerosos procesos celulares que involucran al ADN requieren, por lo general, la modificación de los estados de condensación de la cromatina. Estos pueden ser modificados de diferentes maneras, lo que comprende distintos procesos como el ensamblado y desensamblado de los nucleosomas, el reemplazo de las histonas canónicas por otras variantes, las modificaciones covalentes de las histonas, la remodelación de la cromatina de manera dependiente de ATP, y la metilación del ADN (Verbsky y Richards, 2001; Eberharter y Becker, 2002; Pfluger y Wagner, 2007; Vaillant y Paszkowski, 2007). En particular, las proteínas conocidas como chaperonas de histonas permiten el ensamblado y desensamblado de los nucleosomas al interactuar con las histonas (Park y Luger, 2008; Avvakumov y col., 2011). Las chaperonas de histonas están conservadas en todos los eucariotas y, generalmente presentan afinidad por una clase de histonas, por lo que pueden ser agrupadas en tipo H3-H4 o en tipo H2A-H2B (Tripathi y col., 2015). En *A. thaliana*, las chaperonas H3-H4 son CAF-1 (del inglés, Chromatin Assembly Factor-1), HIRA (del inglés, Histone Regulatory Homolog A) y ASF1 (del inglés, Anti-Silencing Function1); mientras que las chaperonas H2A-H2B son NAP1 (del inglés, Nucleosome Assembly Protein1), NRPs (del inglés, NAP1-Related Proteins) y FACT (del inglés, Facilitates Chromatin Transcription) (Zhu y col., 2012). El rol fisiológico de estas proteínas y sus mecanismos de regulación no han sido aún comprendidos completamente. Sin embargo, mutaciones en algunos de los genes que codifican para chaperonas de histonas están implicadas en causar defectos en la estabilidad del genoma y la expresión génica. Particularmente en humanos, se han relacionado con el cáncer y otras enfermedades (Burgess y Zhang, 2013).

Por otro lado, en plantas se han llevado a cabo estudios para caracterizar el rol de algunas de las chaperonas de histonas. Análisis realizados en plantas de *Arabidopsis* mutantes para los dos genes que codifican para proteínas ASF1 demostraron que, tanto ASF1a como ASF1b, son requeridas para la proliferación celular durante el desarrollo (Zhu y col., 2011). Además, trabajos realizados en nuestro laboratorio mostraron que ambas proteínas ASF1 son blancos de regulación de los factores de transcripción E2F, sugiriendo que su expresión es regulada durante el ciclo celular (Lario y col., 2013). Así mismo, también se determinó que ASF1a y ASF1b están asociadas con la respuesta frente al daño en el ADN inducida por radiación UV-B, ya que plantas que presentan silenciada la expresión de los genes que codifican para dichas proteínas mostraron mayor sensibilidad al UV-B que las plantas salvajes (Lario y col., 2013).

Otra chaperona de histona del tipo H3-H4 es CAF-1, que ha sido estudiada en gran detalle en levaduras, humanos y plantas (Kaya y col., 2001). CAF-1 es un complejo heterotrimérico formado por CHROMATIN ASSEMBLY COMPLEX (CAC) 1, CAC2 y CAC3 en levaduras; p150, p60, y p48 en humanos; y por las proteínas FASCIATA1 (FAS1), FAS2 y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) en *Arabidopsis* (Kaya y col., 2001). Las proteínas CAC1, p150 y FAS1 contienen un dominio KER, que contiene principalmente residuos de lisina, glutamato y arginina; y una región ED, formada por residuos de glutamato y aspartato, que participaría en la interacción con las histonas. Por otro lado,

las proteínas CAC2, p60 y FAS2; y CAC3, p48 y AtMSI1 contienen siete repeticiones WD40, que mediarían las interacciones proteína-proteína (Figura 1.12; Kaya y col., 2001). Las plantas mutantes *fas1* y *fas2* de *Arabidopsis* presentan diversos defectos tanto en el desarrollo foliar como radicular, que están asociados con alteraciones en los meristemas. También presentan inhibición de la mitosis y arresto celular, incremento en la endoreduplicación y en la ramificación de los tricomas en las hojas (Kaya y col., 2001; Exner y col., 2006; Ramirez-Parra y Gutierrez, 2007a). Además, plantas mutantes en CAF-1 tienen alterada la transcripción de ciertos genes, algunos de ellos involucrados en la reparación del ADN y en la síntesis y degradación de la pared celular (Schönrock y col., 2006; Mozgova y col., 2015), como así también fenotipos estrechamente relacionados a la presencia de cortes doble hebra en el ADN, que usualmente activan las respuestas mediadas por ATM, tales como acortamiento de los telómeros, pérdida de ADN<sub>r</sub> 45S (Mozgova y col., 2010; Muchova y col., 2015) y aumento en la recombinación homóloga (Endo y col., 2006; Varas y col., 2015). FAS1, la subunidad más grande del complejo CAF-1, posee en su promotor dos sitios de unión para los factores de transcripción de la familia E2F, y su interacción ha sido demostrada *in vivo* (Ramirez-Parra y Gutierrez, 2007a). Esto sugiere que CAF-1 podría participar en la regulación de la proliferación celular y en la reparación del daño en el ADN en plantas irradiadas con UV. Hasta el momento se ha demostrado que en células humanas en cultivo que fueron irradiadas con UV, CAF-1 es reclutado hasta el sitio donde el ADN se encuentra dañado, de manera dependiente del sistema de reparación NER, lo que sugiere que CAF-1 participaría directamente en la reorganización de la estructura de la cromatina que ocurre cerca del ADN dañado (Green y Almouzni, 2003; Polo y col., 2006). Sin embargo, con anterioridad al comienzo de esta tesis no existían reportes en donde se investigue si CAF-1 cumple una función similar en plantas.



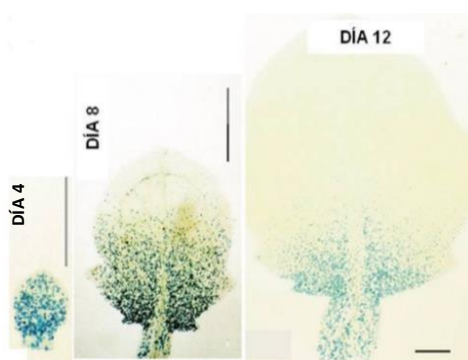
**Figura 1.12.** Las subunidades proteicas del complejo CAF-1 están conservadas en distintos organismos. Las subunidades de humanos se representan en rojo, las de levaduras en amarillo y las de *Arabidopsis* en verde. Los números representan las posiciones de los aminoácidos y el porcentaje de similitud entre humanos y *Arabidopsis*, y entre *Arabidopsis* y levaduras, respectivamente. Adaptado de Reyes y colaboradores (2002).

#### 1.4. Control del desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. Efectos de la radiación UV-B.

Las plantas no tienen un programa de desarrollo fijo sino que, por el contrario, presentan un crecimiento adaptativo. Como consecuencia, la forma de una planta está definida en gran parte por su entorno (Polyn y col., 2015). Como fue descrito previamente, la radiación UV-B a las que se encuentran inevitablemente expuestas las plantas produce cambios morfológicos, siendo una de las respuestas más consistentes en una amplia variedad de especies la inhibición en el desarrollo de las hojas (Ballaré y col., 2001; Searles y col., 2001; Flint y col., 2003).

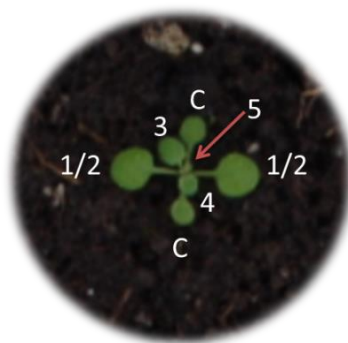
En *A. thaliana*, el crecimiento de las hojas consiste en una etapa de proliferación celular seguida de otra etapa de expansión celular. En estadios tempranos del desarrollo se observan células en proliferación a lo largo de todo el limbo de la hoja (Donnelly y col., 1999). A continuación, el ciclo celular se detiene en el ápice y un frente de arresto mitótico se propaga hacia la base del órgano (Figura 1.13; Donnelly y col., 1999). Una vez que las células cesan de dividirse comienza el proceso de expansión celular, en el cual las células crecen varios miles de veces hasta que las hojas logran su tamaño final (Piazza y col., 2005; Tsukaya, 2006).

A medida que las hojas de *Arabidopsis* van emergiendo, lo hacen en forma de espiral ubicándose cada una en un ángulo de aproximadamente  $120^\circ$  con respecto a su antecesora, formando una roseta basal. En función de ello es que cada hoja prosigue su propio patrón de desarrollo en el tiempo, es decir que en un momento dado, las hojas más viejas estarán en la etapa de expansión celular, mientras que las hojas emergentes estarán en la etapa de exclusiva proliferación celular. Por convención, las hojas se enumeran según el orden de aparición, siendo entonces la hoja #3 más antigua que la hoja #5. En particular, las hojas #1 y #2 son consideradas como equivalentes, ya que en general presentan un comportamiento muy similar (Figura 1.14; Boyes y col., 2001).



**Figura 1.13.** Desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana*. Las imágenes muestran la hoja #8 a los 4, 8 y 12 días de desarrollo de una planta que expresa el promotor de la *Ciclina B1*; 1 (marcador de la fase mitótica) fusionado al gen reportero  $\beta$ -glucoronidasa. A medida que progresa el desarrollo de la hoja #8, el arresto del ciclo celular comienza a ocurrir desde el ápice hacia la base la hoja. Las barras de escala representan 0,5 mm en la fotografía de la izquierda, y 1mm en las dos fotografías restantes. Adaptado de Donnelly y colaboradores (1999).





**Figura 1.14.** Enumeración de las hojas de la roseta de una plántula de *A. thaliana* del ecotipo Columbia-0 de 12 días. La letra C representa a los cotiledones. Los números indican el orden en el que van emergiendo las hojas, por lo que a las más antiguas les corresponden números menores con respecto a las más jóvenes. No es posible distinguir la hoja #1 de la #2 por lo que se representan como 1/2. La flecha roja señala a la hoja #5, que se encuentra emergiendo desde el meristema apical a los 12 días después de la estratificación aproximadamente, por lo que está constituida por células en proliferación activa.

Además de la familia de factores de transcripción E2F, en la que algunos de sus miembros están involucrados en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a la radiación UV-B y el desarrollo de las plantas, existe otro grupo de factores de transcripción que también cumplen funciones fundamentales en el desarrollo, la familia GROWTH REGULATING FACTOR (GRF por sus siglas en inglés).

#### 1.4.1. Los factores de transcripción de la familia GRF y su regulación por el microARN 396.

##### 1.4.1.1. La familia GRF.

La familia GRF es un pequeño grupo de factores de transcripción específicos de plantas, presente en una gran variedad de especies, entre las que se encuentran *A. thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max* (soja), *Solanum tuberosum* (papa), *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz), entre otras (van der Knaap y col., 2000; Kim y col., 2003; Choi y col., 2004; Zhang y col., 2008; Liu y col., 2012; Filiz y col., 2014; Wang y col., 2014; Omidbakhshfard y col., 2015). A pesar de que en los primeros estudios se identificaron roles de los GRFs únicamente durante el desarrollo de las hojas y los tallos (van der Knaap y col., 2000; Kim y col., 2003), más recientemente se encontraron otras funciones durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas, entre los que se encuentran la floración, el desarrollo de la semilla y la raíz, el control del crecimiento en condiciones de estrés y la regulación de la longevidad de las plantas (Rodríguez y col., 2010; Hewezi y col., 2012; Baucher y col., 2013; Casadevall y col., 2013; Liu y col., 2014; Vercruyssen y col., 2015).

En *Arabidopsis*, la familia GRF está constituida por nueve miembros (GRF1-9), los cuales poseen funciones redundantes (Kim y col., 2003). Plantas transgénicas que sobre-expresan *GRF1* o *GRF2* poseen hojas más grandes que las plantas salvajes, mientras que plantas triple mutantes nulas

*grf1x2x3* poseen hojas más pequeñas y angostas, así como cotiledones fusionados. Además, los GRFs actúan en conjunto con miembros de otra familia proteica denominada GRF-INTERACTING FACTORS (GIFs), que funcionan como co-activadores de la transcripción. En *Arabidopsis*, existen tres miembros de la familia GIF, denominados GIF1, 2 y 3 (Kim y Kende, 2004; Horiguchi y col., 2005). Plantas mutantes nulas en *gif1* muestran hojas y pétalos más pequeños y angostos que las plantas salvajes, y plantas doble mutantes nulas en *gif1* y *grf1* muestran un fenotipo cooperativo, demostrando la importancia de dicha interacción para la regulación del desarrollo (Kim y Kende, 2004).

En su estructura, los factores de transcripción GRFs poseen dos dominios característicos, el dominio QLQ y el dominio WRC. El dominio QLQ estaría involucrado en interacciones proteína-proteína, mientras que el dominio WRC contiene una señal de localización nuclear y un motivo de unión al ADN (Kim y Kende, 2004). Además, dentro de éste se encuentra la secuencia de nucleótidos que es reconocida por su regulador pos-transcripcional, el microARN miR396 (Figura 1.15). Es importante mencionar que los transcritos *GRF5* y *GRF6* no poseen un sitio blanco de interacción para dicho microARN (Jones-Rhoades y Bartel, 2004).

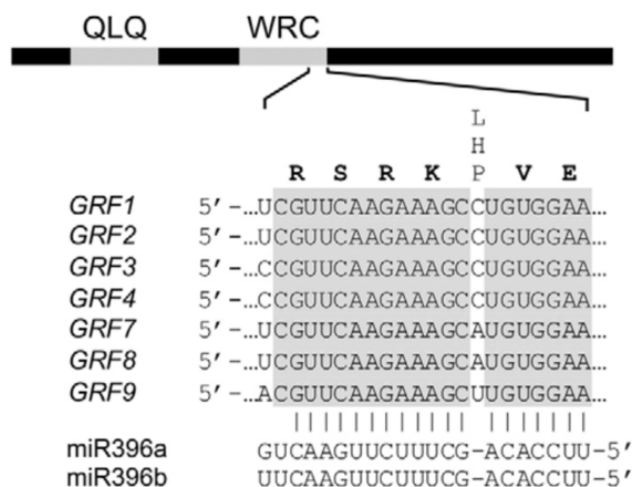
#### 1.4.1.2. El microARN 396.

Los microARNs son el segundo grupo más numeroso de ARN pequeños en plantas, generalmente se hallan codificados en regiones intergénicas, poseen un tamaño final de entre 20 y 24 nucleótidos y regulan pos-transcripcionalmente la expresión de sus genes blanco (Voinnet, 2009). Los microARNs reconocen a su ARNm blanco por complementariedad de bases, y guían su clivaje o el arresto de su traducción por diversos mecanismos (Voinnet, 2009). En particular, el miR396 cumple un rol fundamental en la regulación negativa de la expresión de los factores de transcripción GRF. *Arabidopsis* posee dos miR396 maduros, miR396a y miR396b, que poseen 22 nucleótidos y difieren entre sí en el último nucleótido del extremo 3'.

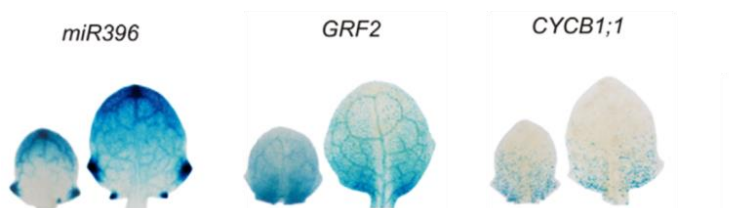
Con el fin de caracterizar el rol funcional del miR396, Rodríguez y colaboradores (2010) siguieron el patrón de expresión del mismo y el de sus genes blanco durante el desarrollo de la quinta hoja de *Arabidopsis*. De esta manera, demostraron que en los primordios foliares, el miR396 tiene una expresión baja, sin embargo, a medida que la hoja se desarrolla, el miARN comienza a acumularse demarcando un gradiente de mayor expresión en el ápice de la hoja y de menor expresión en la base de la misma. Además, mediante fusiones reporteras demostraron que el patrón de expresión del miR396 es opuesto al del *GRF2*, el cual coincide con el patrón de proliferación celular en los primordios foliares (Figura 1.16; Rodríguez y col., 2010; Debernardi y col., 2012). Asimismo, cuando analizaron plantas que expresan una versión del *GRF2* insensible a la regulación por el miR396, observaron que son más grandes y poseen un número de células mayor que las plantas salvajes, mientras que aquellas que sobre-expresan el precursor del *miR396b* presentan una marcada disminución en los



niveles de los transcritos *GRFs*, inhibición de la proliferación celular y son de menor tamaño que las plantas salvajes. Por lo tanto, el miR396 y los *GRFs* en conjunto, cumplen un importante rol en lo que respecta al control del número final de células por hoja.



**Figura 1.15.** Esquema que representa los genes *GRF* y el sitio de unión al miR396. Se detalla la secuencia de nucleótidos, en donde ocurre la interacción de siete de los nueve miembros de la familia *GRF* con el miR396a y el miR396b, que difieren entre sí en un único nucleótido del extremo 3'. QLQ y WRC indican los dominios conservados que caracterizan a la familia *GRF*. Adaptado de Rodríguez y colaboradores (2010).



**Figura 1.16.** Tinción GUS de las hojas #4 (derecha) y #5 (izquierda) de plantas que expresan fusiones del promotor de *miR396*, *GRF2* y *CYCB1;1* al gen reportero que codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa. El patrón de expresión del *GRF2* coincide con el de *CYCB1;1*, y es opuesto al del *miR396*. Además, el nivel de expresión del microARN es mayor en la hoja más antigua con respecto a la más joven, ocurriendo lo opuesto con *GRF2*. La barra de escala representa 1 mm. Adaptado de Debernardi y colaboradores (2012).

#### 1.4.1.2.1. La expresión del miR396 es regulada por el factor de transcripción TCP4.

Los TCPs son una clase de factores de transcripción que controlan numerosos aspectos del crecimiento de las plantas y especialmente el desarrollo de las hojas (Martin-Trillo y Cubas, 2010). Estas proteínas comparten lo que se denomina dominio TCP, una hélice-lazo-hélice (bHLH) que les permite la unión al ADN y llevar a cabo interacciones proteína-proteína (Cubas y col., 1999). El nombre TCP fue definido a partir de la caracterización de sus primeros cuatro miembros, llamados TEOSINTE BRANCHED1 (TB1) de maíz, CYCLOIDEA (CYC) de dragonaria (*Antirrhinum majus*), y PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR 1 (PCF1) y 2 (PCF2) de arroz, los cuales

fueron identificados en base a sus funciones en el desarrollo vegetal o su capacidad de unión al ADN (Cubas y col., 1999; Li y col., 2005). En *A. thaliana* se han identificado 24 factores de transcripción TCP que pueden ser divididos en dos clases en base a la secuencia del dominio TCP. Los de clase I se asocian con la promoción del ciclo celular, mientras que los de clase II se relacionan con procesos involucrados en el arresto del ciclo celular (Kosugi y Ohashi, 2002; Li y col., 2005).

El grupo de TCP clase II en *Arabidopsis* está conformado por cinco miembros: TCP2, TCP3, TCP4, TCP10 y TCP24, que son regulados pos-transcripcionalmente por el microARN miR319. La sobre-expresión del miR319 causa la degradación de estos TCPs y la formación de hojas arrugadas, este fenotipo también se observa en plantas de *Arabidopsis* con pérdida de función en estos factores de transcripción (Palatnik y col., 2003).

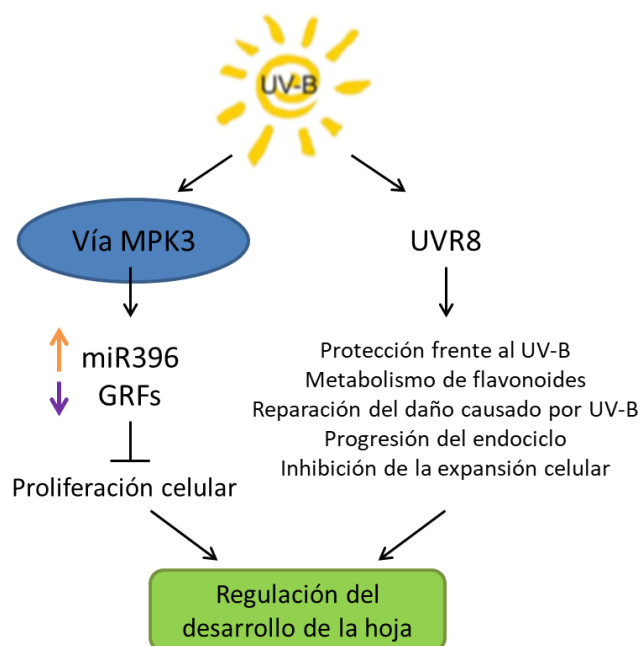
En particular, plantas de *Arabidopsis* con una actividad incrementada del factor de transcripción TCP4 muestran una reducción de la proliferación celular en las hojas, mayores niveles del miR396 y menores niveles de los factores de transcripción de la familia GRF (Rodríguez y col., 2010). De los dos precursores del miR396 presentes en *Arabidopsis*, sólo el miR396b presenta una caja de unión para TCP4 en su promotor, lo cual se relaciona con su patrón de expresión (Schommer y col., 2014). Mientras que el miR396a se expresa principalmente en el sistema vascular de la parte aérea y en las raíces, el miR396b lo hace fuertemente en las hojas, siguiendo el frente de arresto de la proliferación celular (Debernardi y col., 2012). Por lo tanto, TCP4 cumple una función importante en la represión de la proliferación celular, lo que depende en parte, de la activación del miR396 por este factor de transcripción (Schommer y col., 2014).

#### 1.4.2. La vía del miR396 y los GRFs controlan el desarrollo de la hoja en respuesta a la radiación UV-B.

Para una gran cantidad de microARNs se ha predicho, mientras que para otros se ha demostrado experimentalmente, que están involucrados en una variedad de respuestas frente a distintos tipos de estrés abiótico (Lu y Huang, 2008). En particular, se ha evidenciado que el miR396 es regulado por salinidad elevada, sequía y temperaturas extremas, tanto en *Arabidopsis* como en otras especies (Liu y col., 2008; Shen y col., 2010; Zhou y col., 2010; Kantar y col., 2011; Giacomelli y col., 2012). Además, se ha reportado la regulación de algunos miARNs en respuesta a la radiación UV-B en *Arabidopsis* (Zhou y col., 2007).

En base a lo descrito previamente, y a que los GRFs son importantes reguladores del desarrollo de las hojas, proceso que se encuentra severamente afectado por la radiación UV-B, es que previamente a este trabajo de Tesis en nuestro laboratorio se estudió el comportamiento del miR396 bajo dicha condición. Los resultados obtenidos demostraron que la expresión del miR396 es regulada positivamente por la radiación UV-B en hojas constituidas por células en proliferación activa, lo que

conlleva a la disminución en la expresión de los *GRF1*, 2 y 3, causando la inhibición de la proliferación celular, y por lo tanto afectando el crecimiento de las hojas (Casadevall y col., 2013). Además, se investigó cuál es la vía que conduce a la activación del miR396 en respuesta al UV-B, evaluándose la del fotorreceptor UVR8 y las dependientes de las proteínas quinasas ATM y ATR, descriptas previamente, así como también las de las MAP quinasas. Esta última en *Arabidopsis* comprende a las proteínas MPK3 y MPK6 (MPK, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase), que son activadas en condiciones de estrés por UV-B, en particular como consecuencia de la acumulación de dímeros de pirimidina, siendo las plantas mutantes *mpk6* y *mpk3* menos sensibles al estrés causado por UV-B (González Besteiro y col., 2011). Estas MAP quinasas son inactivadas por desfosforilación, reacción que es llevada a cabo por la MAP quinasa fosfatasa 1 (MKP1) (González Besteiro y col., 2011; González Besteiro y Ulm, 2013). Mediante la utilización de diferentes líneas mutantes de *Arabidopsis*, Casadevall y colaboradores (2013) determinaron que la regulación del miR396 por UV-B es independiente de la vía del fotorreceptor UVR8 y de las proteínas quinasas ATM y ATR, pero es dependiente de la vía de la MPK3. Sin embargo, los mecanismos de fotopercepción previos a la activación de esta cascada regulatoria son aún desconocidos. El mecanismo descrito se resume en la Figura 1.17.



**Figura 1.17.** Modelo que representa el efecto del UV-B en la regulación del desarrollo de las hojas. La radiación UV-B produce la inhibición de la proliferación celular mediante la activación de MPK3, conduciendo a un aumento en la expresión del miR396 y a una disminución de la expresión de los *GRFs*. Esta cascada de señalización es independiente del fotorreceptor UVR8. Adaptado de Casadevall y colaboradores (2013).

## Capítulo 2

### Materiales y Métodos



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Para realizar este trabajo de Tesis se utilizó el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Las líneas mutantes y transgénicas utilizadas se listan a continuación, todas ellas pertenecen al ecotipo Columbia 0.

- Línea salvaje Columbia 0 (Col-0).
- Línea transgénica *MIM396*. Posee expresión disminuida del microARN 396 por la tecnología del target mimicry (miR396A (AT2G10606); miR396B (AT5G35407); Debernardi y col., 2012)<sup>1</sup>.

Las plantas *MIM396* han sido transformadas con una construcción que sobre-expresa un transcripto complementario al miR396 (target mimicry), el cual posee una serie de bases que no aparean correctamente con el miARN, por lo cual el transcripto no es digerido sino que captura el miARN impidiendo su acción inhibitoria sobre sus genes blanco (Franco-Zorrilla y col., 2007; Todesco y col., 2010; Debernardi y col. 2012).

- Línea transgénica *E2FcRNAi*. Posee expresión disminuida del factor de transcripción E2Fc (AT1G47870) por la acción de un ARN de interferencia (del Pozo y col., 2006)<sup>2</sup>.
- Línea transgénica *E2FcOE*. Sobre-expresa el ADNc de *E2Fc* que codifica desde el aminoácido 95 hasta el 457, traduciéndose una proteína que carece de la región amino terminal, clave para su degradación, pero que es funcional (del Pozo y col., 2002)<sup>2</sup>.
- Líneas transgénicas *E2FcRNAi*x*MIM396* y *MIM396*x*E2FcRNAi* obtenidas por cruzamiento entre las líneas transgénicas *E2FcRNAi* y *MIM396* durante este trabajo de Tesis.
- Línea mutante *tcp2x3x4x10*. Presenta inserciones de ADN-T en los genes que codifican para *TCP2* (AT4G18390), *TCP3* (AT1G53230), *TCP4* (AT3G15030) y *TCP10* (AT2G31070). Se obtuvo por cruzamiento entre las líneas mutantes SAIL562-D05 (*tcp2*), CS855978 (*tcp3*), SAIL1174-02 (*tcp4*) y SALK\_027514 (*tcp10*) (Bresso y col., 2017)<sup>1</sup>.
- Línea mutante SALK\_151594. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT3G45640, que codifica para la proteína MPK3. En el presente trabajo se la denomina *mpk3*<sup>3</sup>.
- Línea mutante SALK\_033468. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT5g63860, que codifica para la proteína UVR8. En el presente trabajo se la denomina *uvr8*<sup>3</sup>.
- Línea mutante SALK\_103138. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT5G22220, que codifica para el factor de transcripción E2Fb. En el presente trabajo se la denomina *e2fb-1*<sup>5</sup>.
- Línea mutante SALK\_131064. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT5G22220, que codifica para el factor de transcripción E2Fb. En el presente trabajo se la denomina *e2fb-2*<sup>5</sup>.

- Línea transgénica *E2FbOE*, sobre-expresa el ADNc de *E2Fb* bajo el promotor del virus del Mosaico del Coliflor (35S) (Sozzani y col., 2006)<sup>2</sup>.
- Línea mutante SAIL\_662\_D10. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT1G65470, que codifica para la proteína FAS1. En el presente trabajo se la denomina *fas1-4*<sup>4</sup>.
- Línea mutante SALK\_118525. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT5G64630, que codifica para la proteína FAS2. En el presente trabajo se la denomina *fas2-3*<sup>4</sup>.
- Línea mutante SALK\_033228. Presenta una inserción de ADN-T en el gen AT5G64630, que codifica para la proteína FAS2. En el presente trabajo se la denomina *fas2-4*<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Línea transgénica y línea mutante cedidas por el Dr. Javier Palatnik (IBR, Argentina).

<sup>2</sup> Líneas transgénicas cedidas por el Dr. Crisanto Gutiérrez (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, España).

<sup>3</sup> Líneas mutantes cedidas por el Dr. Roman Ulm (Universidad de Ginebra, Suiza).

<sup>4</sup> Líneas mutantes cedidas por el Dr. Lars Henning y la Dra. Iva Mozgová (Universidad Sueca de Ciencias Agrarias y Centro Linnean de Biología Vegetal, Suecia).

<sup>5</sup> Líneas mutantes obtenidas del “Arabidopsis Biological Resource Center” (ABRC, <https://abrc.osu.edu/>), que recopila, preserva, reproduce y distribuye diversas semillas de *A. thaliana* y especies relacionadas.

Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en vasos o bandejas plásticas conteniendo tierra humedecida y esterilizada previamente. A continuación, se cubrieron con un film y se incubaron 48 h a 4°C en oscuridad (estratificación). Luego, se trasladaron a la cámara de cultivo bajo luz blanca en ausencia de radiación UV-B, en condiciones de fotoperíodo, temperatura y humedad controladas (fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 23°C).

Alternativamente, las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas y sembradas en placas conteniendo medio MS (del Inglés Moorashige and Skoog) suplementado con agar 0,7 % (P/V), incubadas 48 h a 4°C en oscuridad, y finalmente, trasladadas a la sala de cultivo.

## 2.2. Tratamientos con radiación UV-B.

Para el tratamiento de las plantas de Arabidopsis con radiación UV-B se emplearon lámparas que emiten dicha radiación (Bio-Rad ChemiDoc™ XRS, catálogo 1708097) a una intensidad de UV-B de 2  $\text{W m}^{-2}$  y de UV-A de 0,6  $\text{W m}^{-2}$ , durante 1 o 4 h dependiendo de lo requerido para cada experimento. Las lámparas fueron recubiertas con un filtro de acetato de celulosa (100 mm, Tap Plastics, Mountain View) que absorbe longitudes de onda por debajo de los 280 nm sin absorber la radiación UV-B de mayores longitudes de onda. Para los tratamientos control (C), es decir en ausencia de UV-B, las

lámparas fueron cubiertas además, con un filtro de poliéster (100 mm, Tap Plastics) que absorbe la radiación UV-B, sin disminuir significativamente la radiación UV-A ( $0,01 \text{ W m}^{-2}$  UV-B y  $0,5 \text{ W m}^{-2}$  UV-A). La radiación suministrada en cada uno de los tratamientos en todos los experimentos, fue registrada usando un detector de radiación UV-A y UV-B (Ultraviolet Radiometer Modelo UV203, Macam Photometrics Ltd., Livingston, Escocia), el cual fue calibrado para las diferentes fuentes de luz con un espectralradiómetro, según las especificaciones del Laboratorio Nacional de Física de Escocia. Además, las plantas recibieron luz blanca a la intensidad descrita previamente. Las muestras fueron recolectadas una vez finalizados los tratamientos o una semana después, dependiendo del objetivo de cada experimento.

#### 2.2.1. Tratamientos con radiación UV-B en ausencia de luz blanca.

De manera alternativa, se realizaron los tratamientos con radiación UV-B o en condiciones control como se describe anteriormente, pero las plantas permanecieron durante las 4 h en ausencia de luz blanca. De esta manera, las plantas recibieron sólo radiación UV-A y UV-B a las intensidades detalladas en la sección 2.2 durante el período de realización del tratamiento.

### **2.3. Purificación de ácidos nucleicos.**

#### 2.3.1. Extracción de ADN genómico.

Para la extracción del ADN genómico, 100 mg de hojas fueron pulverizados en un tubo de microcentrifuga con  $\text{N}_2$  líquido. A continuación se agregaron 0,3 mL de buffer de extracción (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 2 % (P/V) bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)) y se incubó la mezcla a  $65^\circ\text{C}$  durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 0,2 mL de cloroformo invirtiendo suavemente durante 1 min. Se centrifugó la mezcla durante 10 min a  $16300 \times g$  y el sobrenadante acuoso se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo. Luego, el ADN se precipitó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol, incubándose a  $-20^\circ\text{C}$  durante al menos 20 min. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación durante 10 min a  $16300 \times g$  y se lavó con 0,5 mL de etanol 70 % (V/V). A continuación se centrifugó durante 5 min a  $16300 \times g$  y se descartó el sobrenadante. El ADN precipitado se secó a  $37^\circ\text{C}$ , y finalmente, se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada, mezclando suavemente hasta resuspensión total. Los extractos de ADN genómico obtenidos fueron conservados a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

#### 2.3.2. Extracción de ARN.

Se extrajo ARN total de diferentes tejidos de Arabidopsis utilizando el reactivo Quickzol® (Kalium Technologies). Se procesaron entre 10 y 50 mg de tejido por muestra (fresco o almacenado a  $-80^\circ\text{C}$ ) en un tubo de 1,5 mL con  $\text{N}_2$  líquido, hasta la formación de un fino polvo. Luego, se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  del reactivo Quickzol®, se mezcló y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la mezcla durante 20 min a  $12000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ , y el sobrenadante se transfirió a un nuevo

tubo. El siguiente paso fue añadir 0,2 mL de cloroformo, e invertir vigorosamente la mezcla durante 20 s. Luego de incubar las muestras 10 min a temperatura ambiente, se centrifugaron durante 30 min a 12000 ×g a 4°C. La fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un nuevo tubo, en el cual se procedió a precipitar el ARN adicionando 1 volumen de isopropanol frío e invirtiendo el tubo con suavidad. Estas muestras se incubaron durante una hora a -20°C. A continuación las mismas fueron centrifugadas a 12000 ×g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y el sedimento viscoso de ARN en el fondo del tubo se lavó con 1 mL de etanol 75 % (V/V), se mezcló y luego se centrifugó a 10200 ×g durante 5 min a 4°C. Una vez descartado el sobrenadante, el ARN sedimentado se secó durante 15 min a 37°C, y finalmente se disolvió en 20 µL de agua destilada estéril tratada con 0,1 % (V/V) DEPC. Se llevó a cabo una incubación a 60°C durante 15 min para favorecer la disolución. Las muestras fueron almacenadas en freezer a -20°C.

La integridad de los ARN obtenidos fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (P/V), teñidos con Sybr Safe (Invitrogen).

#### **2.4. Electroforesis en geles de agarosa.**

El ADN genómico, el ARN y los productos obtenidos por PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (1 % o 2 % (P/V)) según el tamaño esperado del fragmento a resolver, empleando sistemas de tipo submarino (Sambrook y col., 1989). La solución reguladora 0,5 X TBE (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico, y 1 mM EDTA) se utilizó para la preparación de los geles y como buffer de corrida. Para la tinción de las bandas se agregó Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen) en una concentración final de 1 X, antes de la solidificación del gel de agarosa. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,25 % (P/V) azul de bromofenol, 0,25 % (P/V) xilencianol, y 30 % (V/V) glicerol, en una proporción 5:1 de volumen de la muestra en relación a la solución de siembra. En paralelo, se sembraron 5 µL de los marcadores de 50 o 100 pb (PBL, Productos Biológicos, Embiotec), según corresponda. La Intensidad de la corriente empleada para las electroforesis fue 80 V. Una vez finalizadas las electroforesis, los fragmentos de ADN se visualizaron y registraron empleando el digitalizador de imágenes EpiChem3 (UVP Bioimaging Systems).

#### **2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

Las medidas de la concentración de ácidos nucleicos (ADN o ARN) fueron realizadas utilizando el equipo Qubit® Fluorometer (ThermoFisher Scientific) y los reactivos correspondientes en cada caso (Qubit™ dsDNA HS para ADN y Qubit™ RNA HS para ARN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación de la concentración se sustenta en un ensayo de fluorometría, basado en la capacidad de emisión de fluorescencia de una molécula (fluorocromo) al unirse a dianas específicas



(por ejemplo: ácidos nucleicos). Para llevar a cabo las medidas de concentración, en primer lugar, se preparó una solución de trabajo utilizando 199  $\mu\text{L}$  de buffer Quant-iT™ y 1  $\mu\text{L}$  del reactivo Quant-iT™ por cada muestra cuya concentración se quiso determinar, y por cada una de las soluciones de calibrado. En segundo lugar, se prepararon las dos soluciones de calibrado mezclando 190  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo con 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares provistos por el fabricante. Una vez calibrado el equipo, se prepararon las reacciones para medir concentración mezclando 199  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo con 1  $\mu\text{L}$  de la muestra y se dejó reposar durante 2 min. Finalmente, se colocó el tubo en el equipo y se obtuvo el valor de concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 0,6 mL provistos por el fabricante.

## 2.6. Tratamiento con ADNasa I.

El tratamiento del ARN con ADNasa I se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Para ello, se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con 2 U de la enzima RQ1 DNase I (Promega) durante 30 min a 37°C, en un buffer de reacción 1 X, suministrado por el fabricante. Luego, la enzima se inactivó con el agregado de 1  $\mu\text{L}$  de solución Stop, también provista por el fabricante. De los 21  $\mu\text{L}$  de volumen final obtenidos, 10  $\mu\text{L}$  se utilizaron para la síntesis del ADN copia (ADNc) y 10  $\mu\text{L}$  como control negativo de la retrotranscripción.

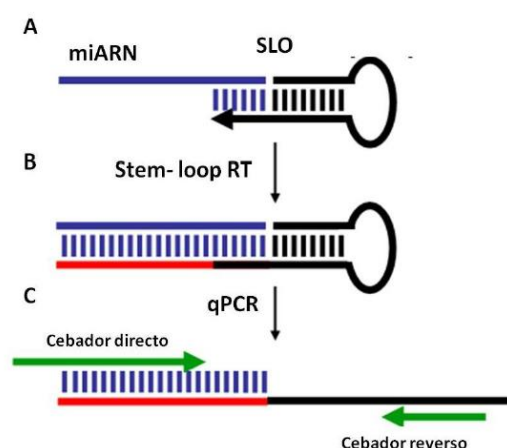
## 2.7. Retrotranscripción (RT).

### 2.7.1. RT con Stem-Loop-Oligo.

Para poder cuantificar los niveles del miR396 mediante RT-PCR en tiempo real, es necesario retrotranscribir el miARN maduro a partir de un cebador especial denominado Stem-Loop-Oligo (SLO). Este cebador tiene forma de tallo y burbuja e hibrida en el extremo 3' del miARN maduro, sirviendo como cebador para la retrotranscripción del miARN (Fig. 2.1A y B, Chen y col., 2005; Varkonyi-Gasik y col., 2007). El SLO tiene una secuencia dada que adopta la estructura de tallo y burbuja por la presencia de bases complementarias, dicha secuencia es la misma independientemente del miARN a cuantificar, excepto por los 6 nucleótidos del extremo 3', los cuales hibridan específicamente con el miARN de interés. Luego, los productos retrotranscritos son amplificados por PCR en tiempo real utilizando dos cebadores, el directo específico para el miARN de interés, y el reverso posee una secuencia universal ya que está diseñado sobre la zona conservada del SLO (Figura 2.1C). Cabe mencionar que en la mezcla de retrotranscripción se agrega además oligo(dT), con el fin de poder retrotranscribir también los ARN mensajeros que poseen colas de poliA.

Para realizar la retrotranscripción, se incubaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de ARN total tratado con ADNasa I, con 0,0125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  oligo(dT)<sub>15</sub>, 0,5 mM dNTPs y 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SLO específico para el microARN396. La mezcla se colocó a 70°C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se enfrió

rápidamente en hielo y se centrifugó brevemente. Luego se añadieron los siguientes componentes al tubo de reacción: 5X bufer First-Strand (suministrado por el fabricante), 5 mM DTT, 100 U de SuperScript III (Invitrogen) y agua libre de ARNasas hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L. Para el control negativo de retrotranscripción se reemplazó el volumen de retrotranscriptasa por agua libre de ARNasas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), incubando la mezcla durante 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 60 min a 50°C y 15 min a 72°C, según lo recomendado por los creadores de la técnica (Chen y col., 2005). Posteriormente, se realizaron diluciones al cuarto, tanto para el ADN copia como para el control negativo. Las muestras se almacenaron en freezer a -20 °C hasta su utilización.



**Figura 2.1.** (A) Esquema representativo de la estructura de un Stem-Loop-Oligo (SLO) y su interacción con un miARN maduro. (B) Producto de la retrotranscripción de un miARN maduro. (C) Esquema de la interacción de los oligonucleótidos utilizados durante la RT-PCR en tiempo real con el producto de retrotranscripción.

### 2.7.2. RT de ARN mensajeros.

En los casos en los que no se pretendía cuantificar el miR396 en la muestra bajo estudio, para la retrotranscripción se siguió el mismo procedimiento descrito, excepto por la adición del SLO, y la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo incubando la mezcla durante 2 h a 42°C, y luego durante 15 min a 72°C a fin de inactivar la enzima.

## 2.8. Amplificación de ácidos nucleicos.

### 2.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ L, utilizando la enzima DNA Polimerasa Go Taq (Promega). El medio de reacción contenía: 1 X buffer de PCR libre de Mg (provisto por el fabricante), 3 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M dNTPs, 0,25  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos cebadores y 0,625 U de ADN polimerasa Go Taq. Como molde se utilizaron 2  $\mu$ L de ADN. Las amplificaciones se

realizaron utilizando el termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). En general, los protocolos de amplificación utilizados comenzaron con una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos que incluyen una etapa de desnaturalización (15 s a 94°C), una etapa de hibridación (20 s a 54°C) y una etapa de elongación (30 s a 72°C). Por último, se realizó una etapa de extensión final (5 min a 72°C). Las etapas utilizadas fueron modificadas según el tipo de ADN molde y cebadores utilizados.

Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 1% o 2% (P/V) de agarosa teñidos con Sybr Safe y utilizando marcadores de 50 o 100 pb, de acuerdo al tamaño del producto esperado.

#### 2.8.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Para el análisis de los niveles de expresión de los transcritos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, plántulas de 12 días se expusieron a la radiación UV-B o permanecieron en condiciones control, como se describe en el apartado 2.2. Una vez finalizados los tratamientos, se recolectó sólo la hoja #5 para utilizarla como material para la extracción de ARN. Esto se hizo inmediatamente después de las 4 h de tratamiento, o luego de una semana, dependiendo del objetivo del experimento. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Por otro lado, también se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando como material de partida plántulas de 6 días, que fueron crecidas en placas de Petri y expuestas a la radiación UV-B, como se detalla en las secciones 2.1 y 2.2, respectivamente. Cuando finalizaron los tratamientos, se recolectaron las plántulas enteras o sólo las raíces, y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el termociclador Applied Biosystems® StepOne™, utilizando las herramientas del programa StepOne Software v2.1 para la obtención de datos (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µL y para cada muestra se realizó un triplicado técnico. Para la amplificación se utilizaron 50 ng de molde, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 X buffer de PCR libre de Mg (proporcionado por el fabricante), 200 µM dNTPs, 0,8 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,5 X Sybr green (Molecular Probes), 0,25 µM oligonucleótido reverso y 0,25 µM oligonucleótido directo.

El protocolo para la PCR en tiempo real fue: desnaturalización previa: 95°C durante 5 min; amplificación: 40 ciclos de las siguientes etapas, 95°C durante 15 s, 54°C durante 20 s, 72°C durante 30 s, durante este paso se realiza la lectura de fluorescencia; elongación final: 72°C durante 5 min; curva de disociación: desde 55°C hasta 95°C, realizándose la lectura de la fluorescencia cada 0,5°C. Como gen normalizador se utilizó el que codifica para la proteína CPK3 (por sus siglas en inglés, *Calcium-dependent-kinase3*; AT4G23650), debido a que su expresión no varía con la radiación UV-B (Ulm y col., 2004).

En la Tabla 1 se describen los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo de Tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nombre del gen
CPK3 F CPK3 R	ATCTGGAGTGCTGGTGTGAT AATCCACCGATGATTAGCA	<i>CPK3</i> (AT4G23650)
E2Fa F E2Fa R	AACCCCGAGATGATCGAA TACCAATGCAGCCGATGA	<i>E2Fa</i> (AT2G36010)
E2Fb F E2Fb R	GCTCGATGGAGTTTGTGG TGCCGATGAAAGAGGAAA	<i>E2Fb</i> (AT5G22220)
E2Fc F E2Fc R	GCTCACCTCTGCATCTGACT AGATGAGTTTTCCGCAACAG	<i>E2Fc</i> (AT1G47870)
E2Fd F E2Fd R	CACAAACGTTAACGCAAAGA GAAAGGGCTTCGATAACTCC	<i>E2Fd/DEL2</i> (AT5G14960)
E2Fe F E2Fe R	TCACACTGAGCAGCGATTT TGGGTGACTTCGCTGAAC	<i>E2Fe/DEL1</i> (AT3G48160)
E2Ff F E2Ff R	GCGGGTATTGGAACAGA GAACGGGCCAAACACATA	<i>E2Ff/DEL3</i> (AT3G01330)
DPa F DPa R	GAGACAAACCCTCACGCAGTA ATGAGCGGAGCTATGTTGAG	<i>DPa</i> (AT5G02470)
DPb F DPb R	TCACAATTTACGCCAGA CTGGAAGAGACGGGGATT	<i>DPb</i> (AT5G03415)
UVR2 F UVR2 R	GACCCGAGTGGATATGTTGG GAGCTGTTCTTCAGCTTTCC	<i>UVR2</i> (AT1G12370)
UVR3 F UVR3 R	TTCAACCGCATCTACTCTCC TCTTCCTCTTGCACTCCTTG	<i>UVR3</i> (AT3G15620)
UVR7 F UVR7 R	TACATTCGGGTCTCTTGCTC TCCTCGTCTTCTTCAACAGG	<i>UVR7</i> (AT3G05210)
UVR8 F UVR8 R	ACGAAGTTACGGCTCCTCCTC CCCAAGAACAACAATGTCACCAG	<i>UVR8</i> (AT5G63860)
HY5 F HY5 R	TCCTTTTCACCAGCTTCG TTTTCCGACAGCTTCTCC	<i>HY5</i> (AT5G11260)
F3H F F3H R	GGAAGAGATTGGAGCTTGC CACACCGAGCCTAGCATAAT	<i>F3H</i> (AT3G51240)
CHS F CHS R	TGATGGCTGGTGCTTCTT GACGTTTCCGAATTGTCG	<i>CHS</i> (AT5G13930)
H4 F H4 R	CAAGCCTGCCATTGCAAG TCCATGGCGGTCACAGTC	<i>H4</i> (AT2G28740)
Knolle F Knolle R	GGTCTTGAAACTGTGGTTGAG CAGTCTTCAGCTCATTAGCTCCATC	<i>Knolle</i> (AT1G08560)
CDKB1;2 F CDKB1;2 R	CACCAACTGAGCAGCAAT GATTTGTCAAGGCTGTCA	<i>CDKB1;2</i> (AT3G54180)

GRF1 F GRF1 R	ATGGAAGAAATGGCGGTGCTC CGGCGGCAGCATTAGTATTGT	<i>GRF1</i> (AT2G22840)
GRF2 F GRF2 R	CACATCAACAGAGGCCGTCATCG AACCGGAGATTCCTTGGTTGTAAG	<i>GRF2</i> (AT4G37740)
GRF3 F GRF3 R	GTCTTCGCTGGCCACAAGTATT TGTTGCTGTTGTAGTGGTGGCT	<i>GRF3</i> (AT2G36400)
ATM F ATM R	GTGGAAGGCGTTTTTCAGG GCATCCTTGTTCCTCG	<i>ATM</i> (AT3G48190)
ATR F ATR R	CCCGCATGTGGCCTTAAT TAGTTTGACAGCGGCATC	<i>ATR</i> (AT5G40820)
SOG1 F SOG1 R	TCAAACGTGATCTGGAGG GATGCGCAAAGGAACTA	<i>SOG1</i> (AT1G25580)
miR396 F miR396 R	GGCGGTTCCACAGCTTTCTT TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	miR396A (AT2G10606) miR396B (AT5G35407)
miR396 SLO	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGGAGACMAGTTC (*)	
Target mimicry (miR396) F Target mimicry (miR396) R	CGTTCGTATCATCGTTTCG TTCATTAACCTTCTCCATCC	
CBP20 F CBP20 R	CCGGCCTATTCTGTGGATTTTGA CATAATTCGTTGGCGCAGCTTGAG	<i>CBP20</i> (AT5G44200)
RPL10A F RPL10A R	TCCTTCTCATTCCGGTGA GCCAAGAACGAAGGAACA	<i>L10A</i> (AT1G14320)
LB ADN-T	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
e2fb-1 F e2fb-1 R	CCGTAAGGACCTTTGA ACAGACAGTGCATCGCTC	<i>E2Fb</i> (AT5G22220)
e2fb-2 F e2fb-2 R	CCGCATGGAACAACTCTTG GGTACTTTTCCAGACTGTG	<i>E2Fb</i> (AT5G22220)
XTH9 F XTH9 R	GGATCAAGAGAACACATG GTGCGTTGAGTTTGTTC	<i>XTH9</i> (AT4G03210)
XTH22 F XTH22 R	GAGTAAAGAGTTGAGAGAGG ATTTTGGACTGACTCGG	<i>XTH22</i> (AT5G57560)
XTH23 F XTH23 R	TCAACGGCCAGTCTTCATG TTACGCAGCTAAGCACTCG	<i>XTH23</i> (AT4G25810)
EXP1 F EXP1 R	GATGTTCACTCAGCGATGG GCCTCGTGCAAAATCAAG	<i>EXP1</i> (AT1G69530)
PCL F PCL R	GGCCGTCGCTGTTAATGAT CTCTGGCAAATGTCTAGAG	<i>PCL</i> (AT3G15720)

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real. (\*) La M señala que el 50 % de la población de oligonucleótidos tiene un C en esta posición, por lo cual el SLO hibrida con el miR396a y el otro 50 % tiene un A, por lo cual el SLO hibrida con el miR396b.

## **2.9. Análisis fenotípicos.**

### **2.9.1. Análisis del crecimiento de la roseta.**

Se sembraron semillas de Arabidopsis del genotipo a analizar en vasos o en bandejas plásticas de 17 x 10 cm, con el suficiente espacio entre ellas con el fin de que las plantas no se superpongan al crecer. Para evaluar el efecto de la radiación UV-B sobre el desarrollo de la roseta, se irradiaron plántulas de 12 días como se describe en la sección 2.2. Una vez finalizado el tratamiento con radiación UV-B o el tratamiento control, las plantas permanecieron en la cámara de cultivo en ausencia de UV-B hasta la finalización del desarrollo vegetativo.

Para analizar la cinética del crecimiento de la roseta, con el fin de caracterizar fenotípicamente el desarrollo de la misma bajo las dos condiciones en estudio, las plantas fueron fotografiadas desde una vista superior cada dos días, a partir del día 8 luego de finalizada la estratificación hasta el día 20. Se determinó el área promedio de las rosetas de al menos 10 plantas, correspondientes a cada condición cada 2 días, utilizando el software Image Pro Plus 6®.

### **2.9.2. Observación microscópica de las células del parénquima en empalizada.**

Las plantas de Arabidopsis de los genotipos analizados fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento (sección 2.2), luego de los cuales permanecieron en la cámara de cultivo hasta el momento de finalización de la expansión de la hoja #5. Este momento se determinó teniendo en cuenta la formación del meristema floral, y observando un tamaño constante de la hoja #5, aproximadamente 4 semanas luego de la estratificación. En este momento se recolectaron cuidadosamente las hojas de interés incluyendo el pecíolo, se las incubó al menos 24 h (y como máximo 3 meses) en una solución fijadora denominada FAA (50 % (V/V) alcohol etílico; 5 % (V/V) ácido acético glacial; 3,7 % (V/V) formaldehído). A continuación, se las incubó durante 24 h en una solución decolorante conteniendo hidrato de cloral, la cual se preparó calentando en agitación 50 mL de agua con 16 mL de glicerol, y adicionando 200 g de hidrato de cloral gradualmente, hasta lograr su completa disolución. A continuación, se montaron las hojas con la cara adaxial hacia arriba, utilizando la solución decolorante como solución de montaje dada la gran viscosidad de la misma, y se tomaron fotografías de las células del parénquima en empalizada utilizando un microscopio diferencial de contraste de interferencia Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japón) con aumento de 40X, y una cámara digital Nikon digital Sight DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón). Se tomaron ocho fotografías por hoja, cuatro a cada lado de la nervadura central, recorriendo espaciadamente cada uno de los lados de la hoja. Utilizando el software Image Pro Plus 6®, se determinó el área de 80 células para cada hoja. Luego, se tomaron fotos de las hojas utilizando una cámara fotográfica, y se determinó el área de las mismas utilizando el software Image Pro Plus 6®. Finalmente, se calculó el número promedio de células por hoja, haciendo el cociente entre el área de la hoja y el área promedio de las células del parénquima en empalizada.

## **2.10. Análisis de la raíz primaria.**

### **2.10.1. Ensayo de elongación de la raíz primaria.**

Para cuantificar la inhibición de la elongación de la raíz primaria causada por la radiación UV-B, las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en placas de Petri como se describe en el apartado 2.1. Luego, las mismas se ubicaron en la cámara de cultivo, en posición vertical para permitir la elongación de las raíces. Después de 5 días de crecimiento, las plántulas fueron expuestas a tratamientos de 1 h con UV-B a una intensidad de  $2 \text{ W m}^{-2}$ , o mantenidas en condiciones control, es decir en ausencia de UV-B. Una vez finalizados los tratamientos, las placas fueron colocadas nuevamente en posición vertical en presencia de luz blanca, y se registró el crecimiento de las raíces desde el día posterior a los tratamientos, hasta 4 días después de finalizados los mismos. Para esto, se dibujó una marca en los extremos de cada una de las raíces, una vez al día durante los 4 días, y finalmente se fotografiaron para su posterior análisis. La medida de la longitud de la raíz primaria fue realizada de forma digital utilizando el programa Image J.

### **2.10.2. Análisis microscópico del meristema radicular y determinación del número de células meristemáticas muertas.**

Para estudiar el efecto de la radiación UV-B sobre las células del meristema radicular, las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en placas de Petri como se describe en el apartado 2.1. A continuación, las placas se ubicaron en la cámara de cultivo en posición vertical para permitir la elongación de las raíces. Luego de 5 días de crecimiento, las plántulas fueron expuestas durante 1 h a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) o permanecieron en condiciones control. Inmediatamente después de finalizado el tratamiento, las placas fueron colocadas en posición vertical, al abrigo de la luz durante 24 h. Una vez transcurrido dicho período de tiempo, las plántulas fueron sumergidas durante 3 min en una solución de yoduro de propidio (IP;  $0,015 \text{ mg mL}^{-1}$ ), un colorante que tiñe las paredes de las células vivas y penetra en las células muertas, tiñéndolas completamente. A continuación, se colocaron sobre un portaobjeto conteniendo  $60 \text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, de modo que la punta de la raíz quede sobre el líquido, y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente, las raíces se observaron y fotografiaron con un microscopio confocal láser de barrido (CLSM, de sus siglas en inglés Laser Scanning Microscope, Nikon C1), utilizando un aumento de 40X y una longitud de onda de excitación de 488 nm; y la emisión fue colectada desde 520 a 720 nm. Sobre las fotos obtenidas se contó el número de células completamente coloreadas en la zona meristemática, correspondientes a las células meristemáticas muertas.

Para llevar a cabo el análisis microscópico del meristema radicular completo, en condiciones control o de tratamiento con radiación UV-B, se procedió de la misma manera que se describe en el párrafo anterior. En las fotografías obtenidas se cuantificó la longitud de la zona meristemática ( $\mu\text{m}$ ), el número

de células de la corteza presentes en la zona meristemática y su longitud ( $\mu\text{m}$ ). Todos los análisis se realizaron de forma digital utilizando el programa ImageJ.

## **2.11. Análisis del daño al ADN.**

### **2.11.1. Ensayo de Dot blot.**

El protocolo para detectar dímeros de pirimidinas por formación de anillo de ciclobutano (DPCs) se adaptó del descrito por Stapleton y Walbot (1994) y se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para DPCs (CAC-NMDND001, CosmoBio Co.) para realizar el ensayo de dot blot. En primer lugar, se extrajo el ADN genómico de la roseta de plantas de 12 días, que fueron irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control, como se describe en las secciones 2.2 y 2.2.1, y se recolectaron inmediatamente luego de finalizados los tratamientos, después de 2 h de recuperación en presencia de luz blanca o de 2h de recuperación en oscuridad.

En segundo lugar, 2  $\mu\text{g}$  de ADN obtenidos de las 6 muestras de cada genotipo en cada condición (cada muestra consiste en ADN extraído a partir de grupos de hojas) fueron desnaturalizados con 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,3 M durante 10 min y sembrados en una membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare), que luego se horneó a 80°C durante 2 h para fijar el ADN. La membrana se bloqueó con 5% (P/V) de leche descremada en polvo en buffer TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) por al menos 1 h, a temperatura ambiente y con agitación continua. Luego, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con buffer TBS, y se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (1:2000 en buffer TBS), también con agitación. El anticuerpo no unido se eliminó realizando tres lavados de 10 min cada uno con buffer TBS, y el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (1:3000, BioRad), se incubó con la membrana durante al menos 1 h a temperatura ambiente, agitando continuamente. Se hicieron nuevamente dos lavados con TBS 1X y se equilibró la membrana con buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) por 20 min. A continuación, se procedió al revelado con 15 mL de una solución conteniendo 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$  de NBT y 0,05  $\text{mg mL}^{-1}$  de BCIP en buffer sustrato, dejando reaccionar en oscuridad hasta observar la aparición de color. Para finalizar la reacción, se eliminó la solución de revelado y la membrana se lavó con agua destilada.

### **2.11.2. Densitometría de las imágenes.**

Las imágenes de las membranas obtenidas de los ensayos de dot blot se adquirieron utilizando el digitalizador de imágenes EpiChem3 (UVP Bioimaging Systems), y las densitometrías se realizaron usando el software Gel-Pro Analyzer.



## 2.12. Determinación de los niveles de ploidía mediante la técnica de citometría de flujo.

Las plantas de *Arabidopsis* crecidas como se detalla en la sección 2.1 fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento, momento en el que la hoja #5 estaba emergiendo. Luego, las plantas continuaron su desarrollo en la cámara de cultivo en ausencia de UV-B, hasta que la hoja #5 se expandió completamente. En ese momento, se recolectaron cuidadosamente 10 hojas #5 y se colocaron apiladas en el centro de una placa de Petri de 3,5 cm de diámetro. A continuación, se agregó 1 mL de buffer de extracción de núcleos (buffer Galbraith: 45 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MOPS, 30 mM citrato de sodio, 0.1% (V/V) Tritón X-100, ajustado a pH 7,0 con 1M NaOH, filtrado a través de una membrana con poros de 0,22 nm de diámetro, y almacenado a -20°C), se hicieron alrededor de 15 cortes transversales en las hojas con un bisturí, y se homogenizó el extracto utilizando una micropipeta. El homogenado se filtró utilizando una malla con poros de 40 µm de diámetro, y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL. A continuación, 300 µL fueron transferidos a un nuevo tubo, al cual se le agregó ARNasa para obtener una concentración final de 50 µg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, el extracto se incubó 10 minutos en hielo y se agregaron 15 µL de IP (concentración final 50 µg mL<sup>-1</sup>). Por último, las muestras se incubaron en hielo y en oscuridad, pudiendo mantenerlas en estas condiciones hasta una hora antes de realizar el análisis. Las muestras se procesaron utilizando el citómetro de flujo Cell Sorter BD FACSAria II, a baja velocidad y registrando al menos 5.000 eventos para obtener datos estadísticamente confiables. Para determinar el índice de endorreduplicación (IE) de cada planta en una condición determinada, se utilizó la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{[(0 \times 2C) + (1 \times 4C) + (2 \times 8C) + (3 \times 16C) + (4 \times 32C)]}{100}$$

## 2.13. Análisis del grosor de la pared celular.

Para analizar el grosor de la pared de las células del parénquima en empalizada, se realizó una tinción con Blanco de Calcofluor. Para esto se utilizó la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis*, que fueron irradiadas con UV-B a los 12 días de crecimiento, como se detalla en la sección 2.2, pero que se recolectaron una semana después haber finalizado los tratamientos. Las hojas se decoloraron en etanol 95% (V/V) durante 24 h y luego se incubaron en oscuridad por al menos 10 minutos en una solución de Calcofluor (17,5 µg mL<sup>-1</sup> de Blanco de Calcofluor (Sigma); 100 mM Tris-HCl, pH 9,0). A continuación se realizaron dos lavados con buffer PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) y se montaron las hojas sobre portaobjetos, cubriéndolas con cubreobjetos. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) con un objetivo de 40X. La longitud de onda de excitación empleada fue de 440 nm y la emisión fue colectada

en el rango de 500-520 nm. El grosor de la pared celular se determinó utilizando el programa computacional Image J, en donde se midió el ancho de la altura media del pico de emisión de fluorescencia. El análisis se llevó a cabo en al menos 20 células del parénquima en empalizada de 5 hojas diferentes, con duplicado experimental.

#### **2.14. Cuantificación de flavonoides y antocianinas.**

La extracción de flavonoides se realizó mediante la maceración de 100 mg de hojas de plántulas de 12 días, con N<sub>2</sub> líquido, seguida de una primera extracción con 0,6 mL de metanol ácido (1% (V/V) HCl en metanol), y posterior incubación durante 8 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 mL de cloroformo y 0,6 mL de agua destilada. La solución resultante se centrifugó durante 2 minutos a 3000 ×g a temperatura ambiente, descartándose la fase orgánica. Sobre la fase acuosa, se realizó un espectro de absorbancia comprendido entre 280 y 600 nm, y se midió absorbancia a 330 nm, correspondiente al máximo de la absorción en el UV-B. Esta misma muestra se utilizó para la cuantificación de antocianinas, mediante la determinación de la absorbancia a 540 nm. Las cantidades totales de estos metabolitos fueron expresadas como Abs por g de tejido fresco.

#### **2.15. Determinación cualitativa del anión superóxido - Tinción con NBT.**

Las plantas de Arabidopsis crecidas en las condiciones indicadas en la sección 2.1 se sometieron a tratamientos control o con radiación UV-B a los 12 días de crecimiento. Luego de finalizado el tratamiento, se recolectaron las plantas enteras, se lavaron con agua, se colocaron en un tubo de 50 mL con una solución 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de NBT en 25 mM Buffer HEPES pH 7,6 y se infiltraron aplicando vacío durante 30 s, a temperatura ambiente. Posteriormente, se reemplazó dicha solución por una de etanol 80% (V/V) y se incubó durante 2 min a 60°C, para favorecer la liberación de clorofilas. Por último, las plantas se lavaron con agua y se fotografiaron.

#### **2.16. Análisis estadístico.**

El grado de significancia de las diferencias analizadas en los distintos experimentos fue obtenido mediante la utilización de las pruebas ANOVA (Análisis de la Varianza) y t de Student. El análisis se realizó en base a una confianza del 95%, es decir, con un valor de  $p < 0,05$ .

## Capítulo 3

Rol de los factores de transcripción  
E2F en las respuestas a la radiación  
UV-B en plantas de  
*Arabidopsis thaliana*.

Interacción con otras vías involucradas  
en el control del desarrollo.



## CAPÍTULO 3

### 3.1. OBJETIVOS

#### 3.1.1. Objetivo general

Estudiar los efectos que causa la radiación UV-B en la proliferación celular en plantas de *Arabidopsis thaliana*, y la participación de los factores de transcripción E2Fc y E2Fb en los mecanismos de respuesta.

Por otro lado, debido a que el control de la división y diferenciación celular es llevado a cabo por diferentes vías, y que se ha demostrado que la vía del microARN miR396 y los GRFs está involucrada en el control de la proliferación celular bajo condiciones de iluminación con UV-B (Casadevall y col., 2013), también se propone profundizar los conocimientos sobre dicha respuesta e investigar si existe una interrelación entre esta vía y la vía del Retinoblastoma en plantas de *A. thaliana*.

#### 3.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente plantas de *A. thaliana* con alteraciones en la expresión de los factores de transcripción E2Fb y E2Fc, en condiciones control y luego de la exposición a la radiación UV-B.
- Evaluar la acumulación del daño en el ADN y los niveles de ploidía en las hojas de plantas de *A. thaliana* mutantes en el factor de transcripción E2Fb.
- Evaluar a nivel molecular las respuestas a la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana* con alteraciones en la expresión de *E2Fc*, mediante el análisis de la acumulación del daño en el ADN y de pigmentos fotoprotectores, el análisis de la expresión de genes involucrados en las respuestas al UV-B y la determinación de los niveles de ploidía en el ADN.
- Caracterizar fenotípicamente la respuesta a la radiación UV-B en hojas y raíces de plántulas de *A. thaliana* que presentan disminuidos los niveles de expresión del microARN 396. Evaluar la acumulación del daño en el ADN y de pigmentos fotoprotectores en las hojas, la expresión de genes involucrados en la respuesta al UV-B, como así también, de los factores de transcripción *E2F* pertenecientes a la vía del Retinoblastoma.
- Realizar cruza entre plantas que presentan disminuida la expresión del miR396 con aquellas que presentan expresión disminuida del factor de transcripción *E2Fc*, y evaluar fenotípicamente y a nivel molecular la respuesta de las plantas resultantes de las cruza a la radiación UV-B.
- Caracterizar fenotípicamente plantas cuádruple mutantes en los factores de transcripción TCP de clase II, tanto en condiciones control como luego de la exposición a la radiación UV-B.
- Analizar los niveles de expresión de los factores de transcripción *E2F* en plantas mutantes en el fotorreceptor UVR8 y en la proteína quinasa MPK3.

## 3.2. Rol del factor de transcripción E2Fc en las respuestas a la radiación UV-B.

### 3.2.1. INTRODUCCIÓN

La forma y la arquitectura de las plantas están determinadas por diversos procesos que modulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos. El tamaño y la forma de los órganos, a su vez, están determinados por el número, tamaño y tipo de células que los constituyen, los que dependen de los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular (Ingram y Waites, 2006). Por lo tanto, mantener una estricta regulación de estos procesos es esencial para la correcta estructuración de las plantas. En general, los principales reguladores de dichos procesos son los factores de transcripción. Sus patrones de expresión frente a las señales de desarrollo son los que establecen una amplia variedad de posibles identidades celulares, alrededor de las cuales, se elaboran las respuestas de las células para permitir el crecimiento y el desarrollo. En la mayoría de los órganos vegetales, sin embargo, el crecimiento es también regulado por factores ambientales, como la luz y la disponibilidad de los nutrientes, por lo que la forma final y el tamaño de un órgano dado se rigen por una interacción compleja de señales generadas de manera endógena y exógena (Ingram y Waites, 2006).

Como se describe en la introducción, la radiación UV-B induce diversas respuestas en las plantas, entre las que se encuentran la inhibición del crecimiento, la acumulación del daño en el ADN y cambios en la expresión génica. La radiación UV-B también provoca un retraso en la transición de las fases G1/S del ciclo celular, lo que podría ser un mecanismo de protección para prevenir que las células que poseen daño en el ADN se dividan, lo que resultaría en la inhibición del crecimiento bajo este tipo de radiación (Jiang y col., 2011). Por lo tanto, los puntos de control del ciclo celular son fundamentales para evitar que errores que afectan la integridad del genoma puedan tener serias consecuencias en el desarrollo del organismo completo (Berckmans y De Veylder, 2009).

En eucariotas superiores, la vía del Retinoblastoma es fundamental debido a que los factores de transcripción E2F regulan la expresión de genes requeridos para las transiciones G1/S, G2/M y la progresión a través de la fase S (Trimarchi y Lees, 2002). Estos factores de transcripción pueden actuar como activadores o represores de la expresión génica, determinando la continuidad del ciclo celular o el inicio del endociclo.

En particular, E2Fc pertenece al grupo de factores de transcripción típicos de la vía del Retinoblastoma debido a que forma dímeros con la proteína de dimerización DPb, siendo el complejo E2Fc/DPb el que se une al ADN. La expresión máxima de *E2Fc* ocurre durante la fase S del ciclo celular, en la cual regula negativamente la transcripción de sus genes blanco, siendo una de sus funciones principales evitar que las células continúen con el ciclo celular, induciendo el inicio del endociclo (del Pozo y col., 2002 y 2006). Además, se ha comprobado experimentalmente que la expresión ectópica de *E2Fc* en plantas produce la inhibición de la proliferación celular (del Pozo y col., 2002).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado mediante análisis histoquímicos de plantas transgénicas que poseen la región promotora de *E2Fc* (1,2 Kb) fusionada al gen reportero *GUS*, que *E2Fc* se expresa en células en división y en células recientemente diferenciadas de plántulas jóvenes, encontrándose principalmente en áreas meristemáticas del ápice y de la raíz. Por otro lado, se determinó que *E2Fc* se expresa, en menor medida, en el tejido vascular y en los tricomas de rosetas de 2 semanas de edad. En estadios más avanzados del crecimiento, se detectó en los meristemas florales y durante el desarrollo de la flor, quedando su expresión finalmente restringida al polen. Estos patrones de expresión se correlacionaron con la actividad *GUS*, y además fueron corroborados por ensayos de RT-qPCR, y sugieren que *E2Fc* cumple su rol principalmente en células en división, pero también lo hace en células diferenciadas (del Pozo y col., 2002).

Por otro lado, de Jager y colaboradores (2009) demostraron que *E2Fc* también es capaz de regular positivamente la expresión de determinados genes. Dentro de este grupo se incluyen aquellos involucrados en la señalización por luz, y también genes que se expresan durante diferentes procesos metabólicos, particularmente los que se encuentran involucrados con el metabolismo del carbono. Además, la regulación de la expresión génica llevada a cabo por *E2Fc*, ya sea de manera positiva o negativa, en la mayoría de los casos, no es una función antagónica a la de *E2Fa*, ya que este factor de transcripción participa en la regulación de otro grupo diferente de genes. En este punto es importante mencionar que se ha demostrado que *E2Fa* regula la expresión de *E2Fc*, debido a que las plantas mutantes en *E2Fa* muestran un incremento en la expresión de dicho factor de transcripción (Magyar y col., 2012). Por otro lado, *E2Fc* y *E2Fb* regulan de manera opuesta la expresión de *E2Fe* al competir por el mismo sitio de unión en su región promotora, lo que también es dependiente del régimen de luz (Berckmans y col., 2011). *E2Fe* cumple un rol fundamental en la respuesta de las plantas frente a la radiación UV-B al regular la expresión de la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs, y la transición hacia el endociclo (Radziejewski y col., 2011). Esto indica que hay una compleja red regulatoria en la que participan los complejos RBR-E2F-DP para mantener el balance entre la proliferación y la diferenciación celular en plantas, de manera dependiente de las condiciones ambientales.

En lo que respecta a la regulación de la actividad de *E2Fc*, se ha demostrado que además de ser regulada a través de su interacción con la proteína RBR, también es regulada por proteólisis. Este proceso es llevado a cabo por la vía del proteosoma, en la que participa el complejo SCF<sup>AtSKP2</sup>, que se encuentra constituido por las proteínas E3 Ubiquitin-ligasa Skp1, Cullin y F-box, y ocurre cuando *E2Fc* es fosforilada por el complejo AtCDKA;1/CYC. Además, la degradación de *E2Fc* es dependiente de la luz, por lo que se ha postulado que este factor de transcripción funcionaría en la transición desde la escotomorfogénesis hacia la fotomorfogénesis, reprimiendo la división celular bajo condiciones de oscuridad (del Pozo y col., 2002).

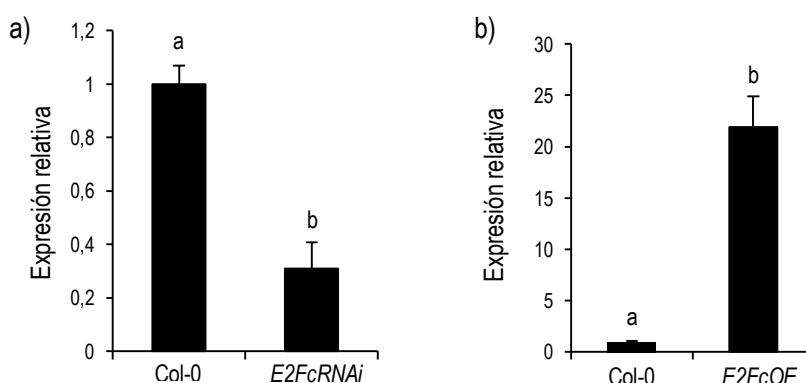
Por lo anteriormente descrito, es probable que E2Fc funcione como activador o represor transcripcional, dependiendo de la fase de desarrollo de la planta, así como también de las condiciones ambientales. Por lo tanto, nos propusimos evaluar si el factor de transcripción E2Fc participa en la respuesta de las plantas frente a la radiación UV-B.

### 3.2.2. RESULTADOS

#### 3.2.2.1. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan niveles alterados en la expresión del transcripto que codifica para E2Fc.

##### 3.2.2.1.1. La radiación UV-B afecta diferencialmente el crecimiento de las hojas de las plantas *E2FcRNAi* pero no el de las plantas *E2FcOE*.

Previamente a realizar la caracterización fenotípica de las respuestas de las plantas transgénicas *E2FcRNAi* y *E2FcOE* a la radiación UV-B, se determinaron los niveles del transcripto *E2Fc* en las hojas de estas plantas mediante ensayos de RT-qPCR. Los resultados obtenidos muestran que las hojas de las plantas *E2FcRNAi* presentan significativamente disminuida la expresión de *E2Fc*, mientras que en las hojas de las plantas *E2FcOE* se encuentra significativamente aumentada, en relación a los niveles determinados en la línea salvaje Col-0 (Figura 3.1a y b).



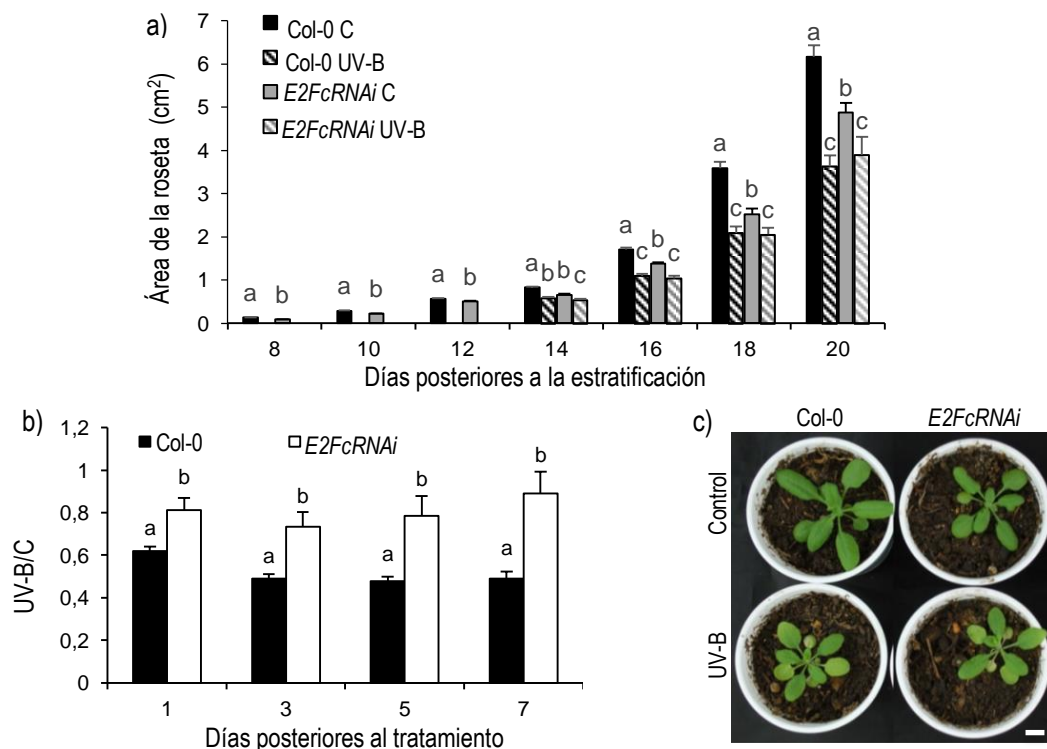
**Figura 3.1.** Cuantificación de los niveles del transcripto *E2Fc* en plantas salvajes Col-0 y en plantas las líneas transgénicas a) *E2FcRNAi* y b) *E2FcOE* mediante ensayos de RT-qPCR. Las barras representan la expresión promedio de *E2Fc* relativizada al promedio de las medidas obtenidas en las plantas salvajes Col-0. Como gen normalizador se utilizó *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, para abordar nuestro estudio, nos basamos en investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo, en las cuales se demostró que plántulas de *Arabidopsis* que son expuestas a un único pulso de radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h, posteriormente presentan a lo largo de su desarrollo hojas de menor tamaño que las plantas crecidas en condiciones control, es decir en ausencia de UV-B (Casadevall y col., 2013). Por lo tanto, analizamos el efecto de un tratamiento similar con radiación UV-B sobre el tamaño de la roseta de plantas con niveles alterados de *E2Fc*. Para esto, plántulas de 12 días de la línea salvaje Col-0 y de la línea transgénica *E2FcRNAi* fueron expuestas al UV-B o mantenidas en condiciones control por 4 h, y una vez finalizados los tratamientos, continuaron

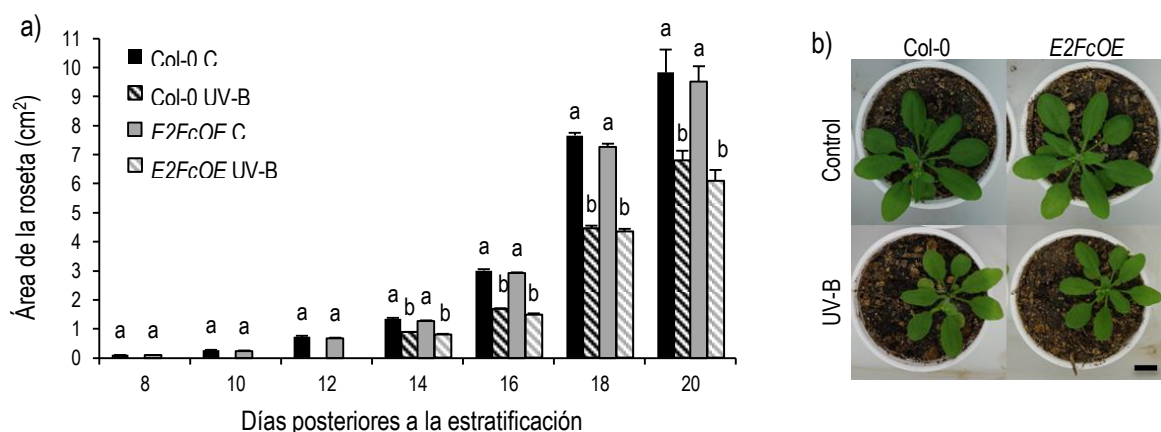


su desarrollo en la cámara de cultivo en ausencia de UV-B. Desde el momento de la germinación hasta la finalización del desarrollo vegetativo se tomaron fotografías cada dos días, para cuantificar el área de la roseta, en las dos condiciones de estudio. El gráfico de la Figura 3.2a representa el área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación, en donde se muestra que las plantas *E2FcRNAi* presentan menor área de roseta en condiciones control de crecimiento con respecto a las plantas salvajes a lo largo de todo su desarrollo, como había sido previamente reportado por del Pozo y colaboradores (2006). Sin embargo, no se observaron diferencias de tamaño entre las plantas salvajes y las transgénicas que fueron irradiadas con UV-B, lo que indica que las plantas *E2FcRNAi* muestran una menor inhibición del crecimiento de la roseta que las plantas salvajes. Este resultado puede interpretarse más claramente al observar el gráfico de la Figura 3.2b, en donde se representa la relación entre el área de la roseta de plantas irradiadas con UV-B con respecto al de las plantas que permanecieron en condiciones control, siendo el promedio mayor para la línea transgénica con respecto a la línea salvaje. La fotografía de la Figura 3.2c es un ejemplo representativo de las plantas salvajes y transgénicas *E2FcRNAi* de tres semanas, que fueron tratadas como se describe anteriormente.

Seguidamente, se analizó el área de la roseta en plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcOE*. En condiciones control, ambas líneas presentan áreas promedio similares, como fue descrito por del Pozo y colaboradores (2002) (Figura 3.3a). Si bien luego de la exposición a la radiación UV-B se observó una marcada disminución en el área de la roseta, esta disminución es similar en las dos líneas en estudio. En la Figura 3.3b se muestran fotografías tomadas al final del crecimiento vegetativo de estas plantas, que representan los resultados obtenidos, y en donde se puede observar la marcada disminución en el área de la roseta en las plantas que fueron expuestas al UV-B.



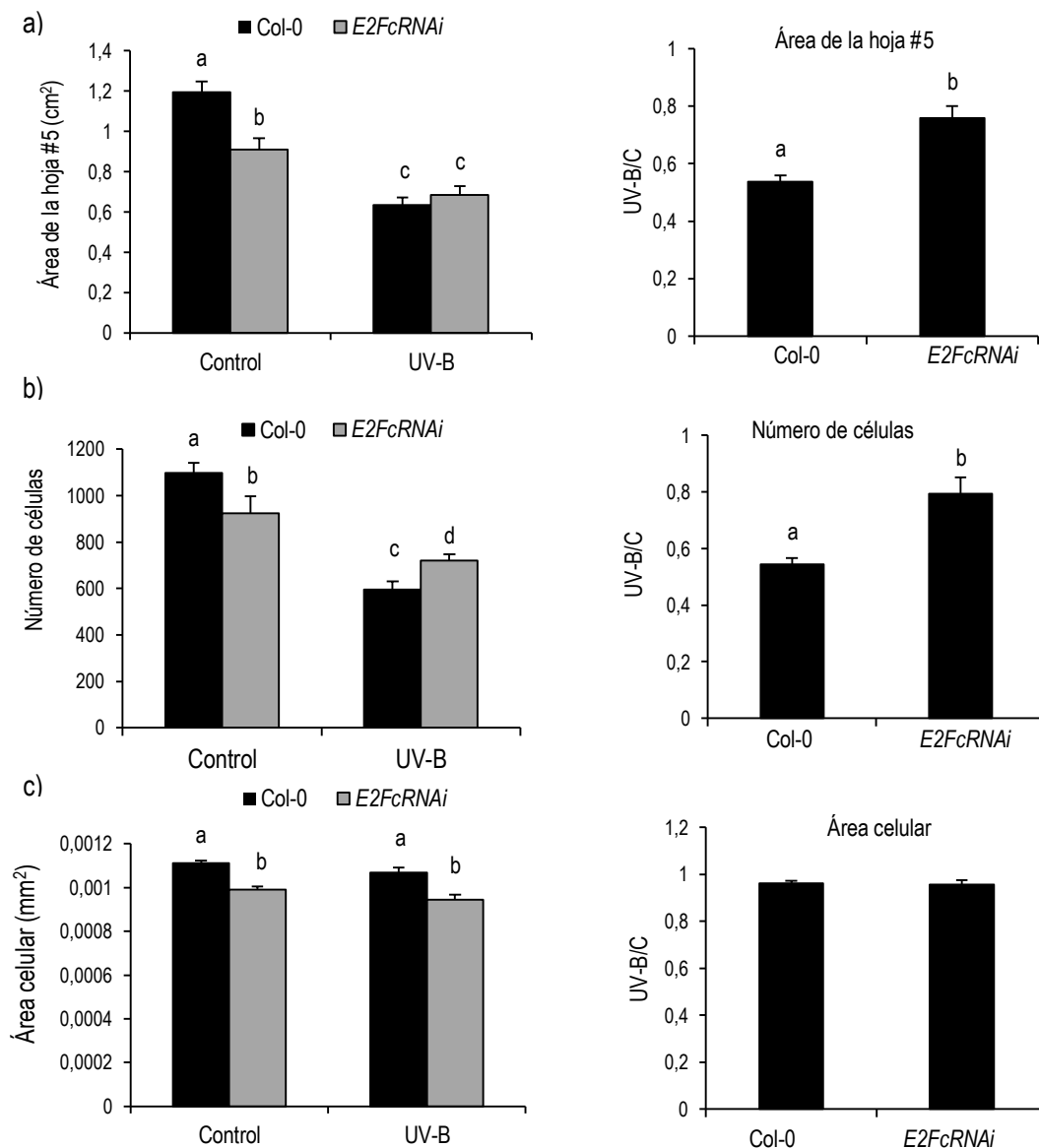
**Figura 3.2.** a) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi*, expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control (C). Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas, y las barras de error representan al error estándar. Para cada día, las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) Las barras representan el promedio de la relación UV-B/C entre áreas para cada genotipo. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografía de las plantas salvajes y *E2FcRNAi* de 21 días, que fueron tratadas con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control, a los 12 días de crecimiento. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



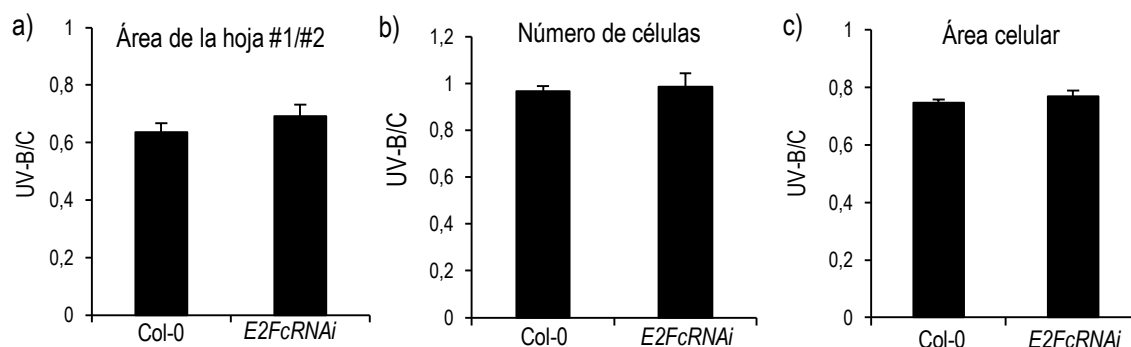
**Figura 3.3.** a) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes y transgénicas *E2FcOE* expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control (C). Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas, y las barras de error representan al error estándar. Para cada día, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) Fotografías de plantas salvajes y transgénicas que fueron expuestas a los dos tipos de tratamiento a los 12 días de crecimiento, tomadas luego de la finalización de desarrollo vegetativo. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, para analizar si la disminución en el crecimiento de la roseta observado en las plantas expuestas al UV-B ocurría como consecuencia de alteraciones en la proliferación celular y/o en la expansión celular, se estudió el efecto del mismo tratamiento con UV-B sobre el tamaño de las hojas #1/#2 y #5. En plántulas de 12 días, las hojas #5 se encuentran en la fase inicial del desarrollo, por lo que en el momento en el que se realizaron los tratamientos estaban constituidas mayoritariamente por células en proliferación activa. Por el contrario, las células de las hojas #1/#2 ya se encontraban, en su mayoría, en la etapa de expansión celular. Una vez finalizado el desarrollo vegetativo, se cuantificó el área de las hojas #1/#2 y #5 en todas líneas y en las dos condiciones de tratamiento. Además, se determinó microscópicamente el área de las células del parénquima en empalizada y se calculó el número de las mismas al realizar el cociente entre el área de la hoja y el área promedio de las células. A partir de los resultados obtenidos, se determinó que las hojas #5 de las plantas *E2FcRNAi* presentan una menor inhibición del crecimiento que las mismas hojas de las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B, en concordancia a lo observado cuando se analizó el área de la roseta (Figura 3.4a). Esto ocurre porque las hojas muestran una menor disminución en el número de células (Figura 3.4b), lo cual sería consecuencia de una menor inhibición de la proliferación celular, ya que el área celular no se encuentra afectada por los tratamientos (Figura 3.4c). Es importante mencionar que el área de las células de las hojas *E2FcRNAi* es menor que el de plantas salvajes Col-0, como había sido descrito por del Pozo y colaboradores (2006), lo que estaría relacionado con un menor índice de endoreduplicación causado por la disminución en la expresión de *E2Fc*.

Por otro lado, el área de las hojas #1/#2 también disminuye en las plantas expuestas a la radiación UV-B, pero en igual proporción en las líneas Col-0 y *E2FcRNAi* (Figura 3.5a). Al realizar el análisis microscópico de las hojas, se determinó que el número de células del parénquima en empalizada no se modifica con los tratamientos (Figura 3.5b), mientras que el área de dichas células disminuye en las plantas tratadas con UV-B con respecto a las que permanecieron en condiciones control. Esta disminución también es similar entre las hojas salvajes Col-0 y las hojas *E2FcRNAi* (Figura 3.5c).

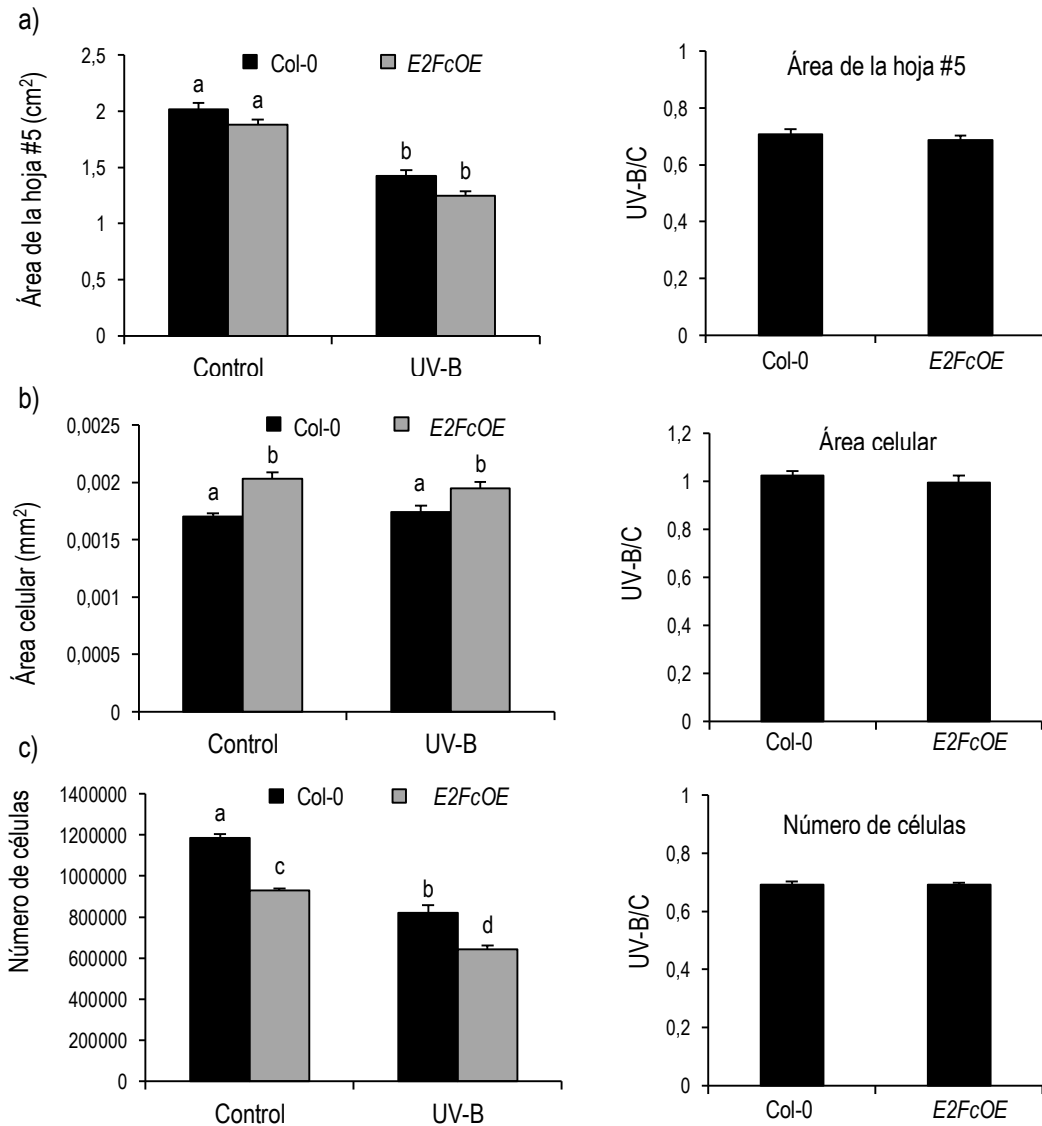


**Figura 3.4.** Análisis de las hojas #5. a) Área promedio de las hojas #5, b) Número promedio de las células del parénquima en empalizada y c) Área promedio de las células del parénquima en empalizada de plantas salvajes y transgénicas tratadas con radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de al menos 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ; gráficos a la izquierda) o la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ; gráficos a la derecha). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



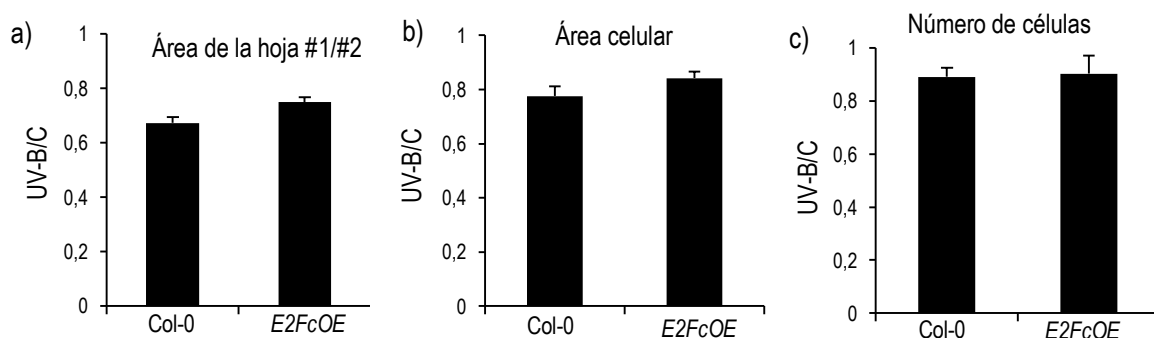
**Figura 3.5.** Análisis de las hojas #1/#2. Los gráficos representan la relación de a) el área promedio de la hoja, b) el número promedio de las células del parénquima en empalizada y c) el área promedio de las células del parénquima en empalizada de las plantas irradiadas con UV-B con respecto a las plantas mantenidas en condiciones control. Los resultados representan el promedio de al menos 10 plantas y las barras de error corresponden al error estándar. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

En lo que respecta al análisis de las hojas de las plantas *E2FcOE*, previamente del Pozo y colaboradores (2002) describieron que los cotiledones de estas plantas crecidas en oscuridad presentan células de la epidermis y del parénquima de mayor tamaño que las células de las plantas salvajes Col-0. Esto fue atribuido al rol que cumple E2Fc como inhibidor de la proliferación celular y activador del inicio del endociclo, lo que llevaría a obtener un aumento del área celular. Al analizar el área de las hojas #5 completamente expandidas de las plantas salvajes Col-0 y las plantas transgénicas *E2FcOE*, se observó que es similar entre ambas líneas, tanto en plantas crecidas en ausencia de UV-B como en aquellas expuestas a esta radiación. No obstante, luego de la exposición al UV-B, se observa una disminución significativa en el área de estas hojas en ambos genotipos (Figura 3.6a). El análisis microscópico de las mismas hojas, mostró que las células del parénquima en empalizada son de mayor tamaño en la línea *E2FcOE* que en la línea salvaje Col-0, lo que se corresponde con lo reportado en la literatura. Si bien el área celular no se modifica por los tratamientos (Figura 3.6b), el número de células en las plantas irradiadas con UV-B disminuye de manera similar en la línea *E2FcOE* y en la línea salvaje Col-0 (Figura 3.6c). Es importante destacar que las hojas #5 de las plantas *E2FcOE* contienen menos células pero de mayor tamaño que las hojas #5 de las plantas salvajes Col-0, lo que demuestra que la sobre-expresión de la proteína de dimerización DPb, con la que E2Fc forma heterodímeros para unirse al ADN, no es requerida para obtener el fenotipo observado.



**Figura 3.6.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre las hojas #5 completamente expandidas de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcOE* que fueron irradiadas con UV-B o permanecieron en condiciones control, a los 12 días de crecimiento. a) Área promedio de las hojas #5, b) área promedio de las células del parénquima en empalizada de las hojas #5 y c) número promedio de las células del parénquima en empalizada de las hojas #5. Las barras representan el promedio de 10 hojas y las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). En los gráficos que se encuentran a la derecha se representa el promedio de la relación entre los resultados obtenidos en condiciones de irradiación con UV-B, con respecto a los obtenidos para la condición control (C), para cada uno de los parámetros analizados, en la línea salvaje Col-0 y en la línea transgénica *E2FcOE*. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, se realizó el mismo análisis en las hojas #1/#2 de plantas salvajes Col-0 y *E2FcOE*, observándose para ambos genotipos una disminución del área de las hojas por UV-B como consecuencia de una disminución del área de las células, sin observarse diferencias significativas entre los distintos genotipos (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre las hojas #1/#2 completamente expandidas de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcOE*, que fueron irradiadas con UV-B por 4 h a los 12 días de crecimiento o que permanecieron en condiciones control. En los gráficos se representa el promedio de la relación UV-B/C para a) el área de las hojas #1/#2, b) el área de las células del parénquima en empalizada, y c) el número de células del parénquima en empalizada. Las barras de error corresponden al error estándar. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Por lo tanto, dado que *E2Fc* actúa como un regulador negativo de la proliferación celular, a la vez que regula positivamente el inicio del endociclo (del Pozo y col., 2006), y en base a los resultados obtenidos, concluimos que *E2Fc* también cumple un rol fundamental en el control de estos procesos cuando las plantas son irradiadas con UV-B, sin embargo, no participaría de los procesos involucrados en la inhibición de la expansión celular bajo este tratamiento. Además, la sobreexpresión de *E2Fc* no modifica la inhibición del crecimiento de las hojas por UV-B, lo que sugiere que el nivel umbral en el que se expresa este factor de transcripción en las células, sería suficiente para cumplir su función regulatoria frente a esta radiación.

#### 3.2.2.1.2. Las hojas de las plantas *E2FcRNAi* presentan alterada la expresión de diversos genes involucrados en el control de la proliferación celular y el desarrollo.

Con el fin de investigar a nivel molecular las causas de los fenotipos observados en las hojas de las plantas transgénicas *E2FcRNAi*, se cuantificó por RT-qPCR la expresión de genes involucrados en el control del desarrollo y en la proliferación celular, utilizando como material de partida grupos de hojas #5 provenientes de plantas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi* de 12 días, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. Para ello, se determinaron los niveles de transcritos de los demás factores de transcripción que constituyen la vía del Retinoblastoma, junto con los de las proteínas de dimerización. Además, se analizó el perfil de expresión de genes que se expresan en distintas fases del ciclo celular, como así también el de los factores de transcripción de la familia GRF y del miR396, que se encuentran involucrados en el control del desarrollo de las hojas bajo condiciones de iluminación con UV-B (Casadevall y col., 2013).

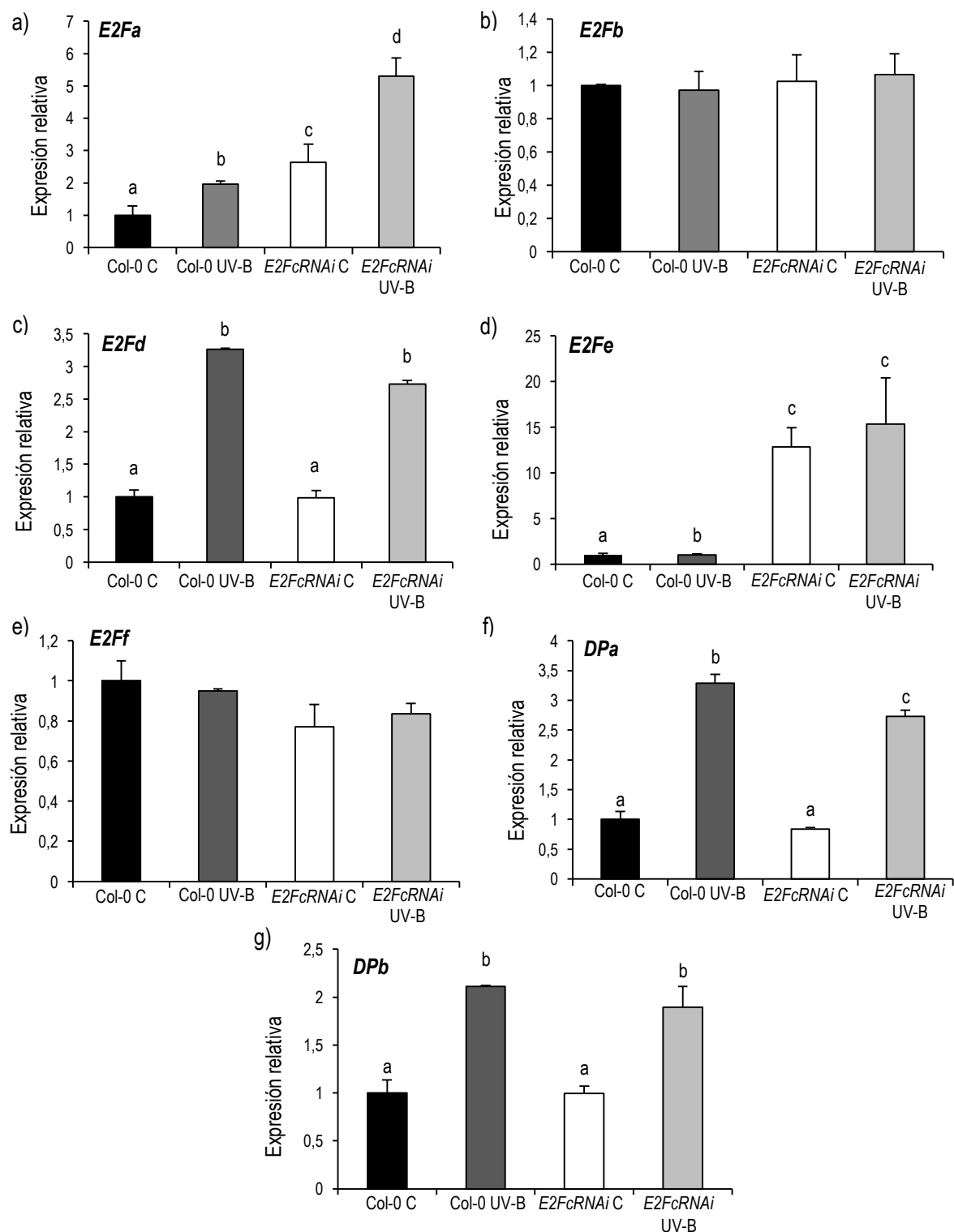
Con respecto a los genes que conforman la vía del Retinoblastoma, la expresión de *E2Fa* y de *E2Fe* se encuentra aumentada en las células en proliferación activa de la línea *E2FcRNAi*, tanto en condiciones control como luego de la exposición a la radiación UV-B, en comparación con lo que ocurre en la línea salvaje Col-0 (Figura 3.8a y d). A su vez, si bien la expresión de *DPa* es similar en las dos líneas en condiciones control, se observó un aumento en su expresión en las hojas #5 de plántulas expuestas al UV-B, siendo dicha inducción menor en la línea transgénica (Figura 3.8f). Para los genes *E2Fb*, *E2Fd*, *E2Ff* y *DPb*, se obtuvieron resultados similares entre las dos líneas, bajo las dos condiciones en estudio (Figura 3.8b, c, e y g).

Por otro lado, previamente a este trabajo de Tesis, del Pozo y colaboradores (2006) determinaron que *E2Fc* regula la expresión de genes del ciclo celular, entre los que se encuentran *H4* y *CDC6*, dos marcadores de la fase S; *CYCB1;1*, un marcador de la transición G2/M, y *Knolle*, que codifica para una proteína con un rol fundamental durante la citocinesis. En base a esto, analizamos la expresión de los genes *H4* y *Knolle* en las hojas #5 de plantas salvajes y *E2FcRNAi*. En condiciones control, es decir en ausencia de UV-B, los niveles de ambos transcriptos se encuentran levemente aumentados en las hojas #5 de plántulas *E2FcRNAi*. Luego de la exposición a la radiación UV-B, estos transcriptos, junto con el del gen *CDKB1;2* (del inglés Cyclin-Dependent Kinase B1;2), un marcador de la fase G2, disminuyen abruptamente, pero esta disminución es menor en la línea *E2FcRNAi* en comparación a la línea salvaje Col-0 (Figura 3.9a, b y c). Estos resultados indican que *E2Fc* también sería necesario para regular la expresión de estos genes en células en proliferación activa en respuesta a la radiación UV-B.

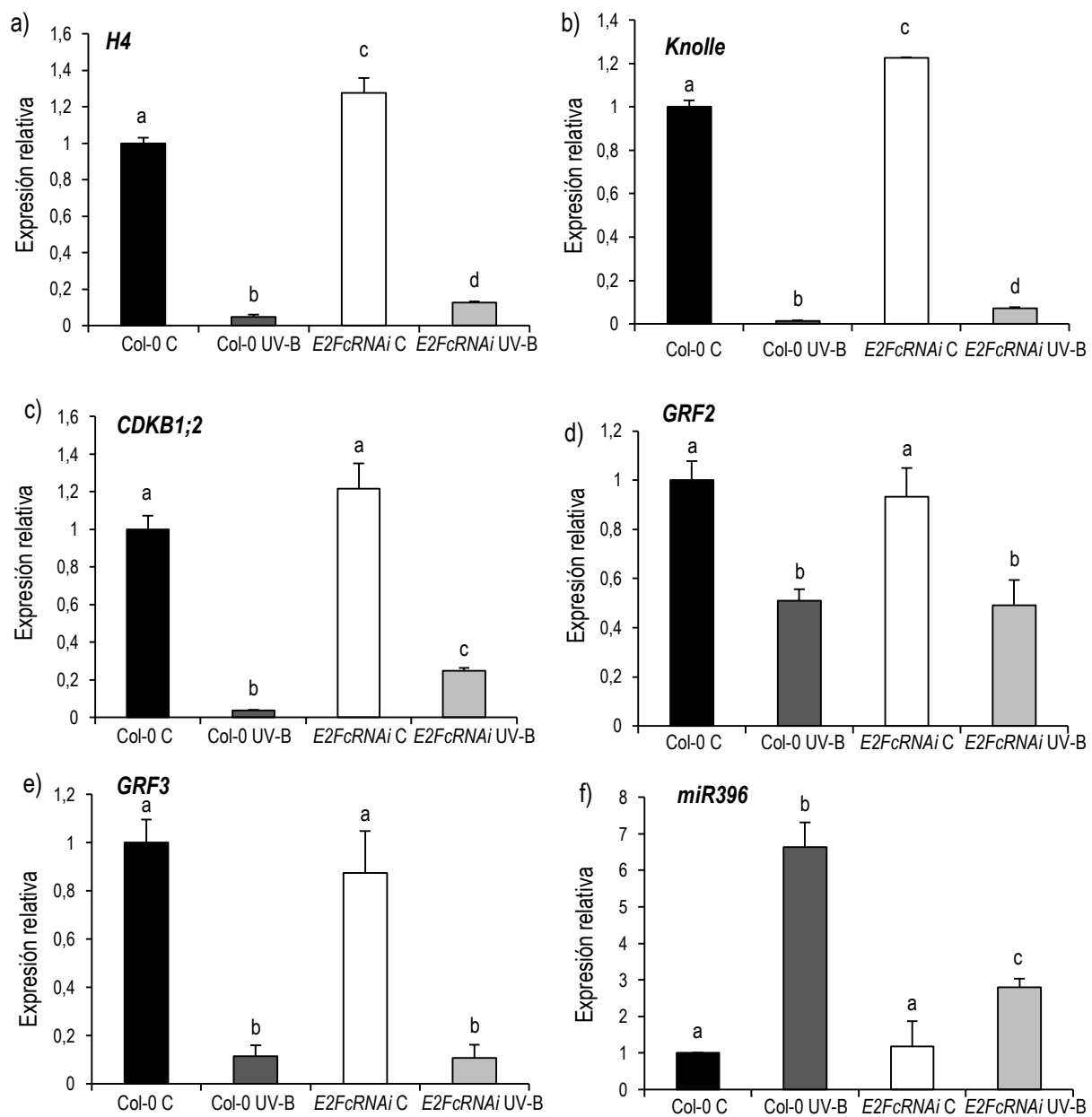
Por otra parte, se analizó el perfil de expresión de los factores de transcripción *GRF2* y *GRF3*, y el de su regulador negativo, el *miR396*. Como fue descripto anteriormente, constituyen una vía que cumple un rol fundamental en la inhibición de la proliferación celular y el desarrollo de las hojas bajo irradiación con UV-B, por lo tanto, se investigó si su expresión se encuentra alterada en las plantas *E2FcRNAi*. Los niveles de expresión de *GRF2* y *GRF3*, tanto en condiciones control como luego de la exposición al UV-B, son similares entre la línea transgénica y la línea salvaje, notándose una marcada disminución en las hojas #5 de las plántulas tratadas con UV-B (Figura 3.9d y e). Sin embargo, aunque la expresión del *miR396* aumenta a causa de la irradiación con UV-B en células en proliferación activa de ambos genotipos, dicho incremento es menor en la línea transgénica que en la línea salvaje (Figura 3.9f). Por lo tanto, *E2Fc* podría regular los niveles del *miR396* bajo condiciones de irradiación con UV-B, sin afectar la expresión de los *GRFs*.

Posteriormente, se examinó a distintos tiempos la expresión de determinados transcriptos y se demostró que luego de 4 horas de exposición a la radiación UV-B, los cambios en la expresión de los genes del ciclo celular y del *miR396*, son más evidentes que aquellos cuantificados a tiempos más cortos de exposición al UV-B, o bajo condiciones que permiten la recuperación en ausencia de UV-B (Figura 3.10).

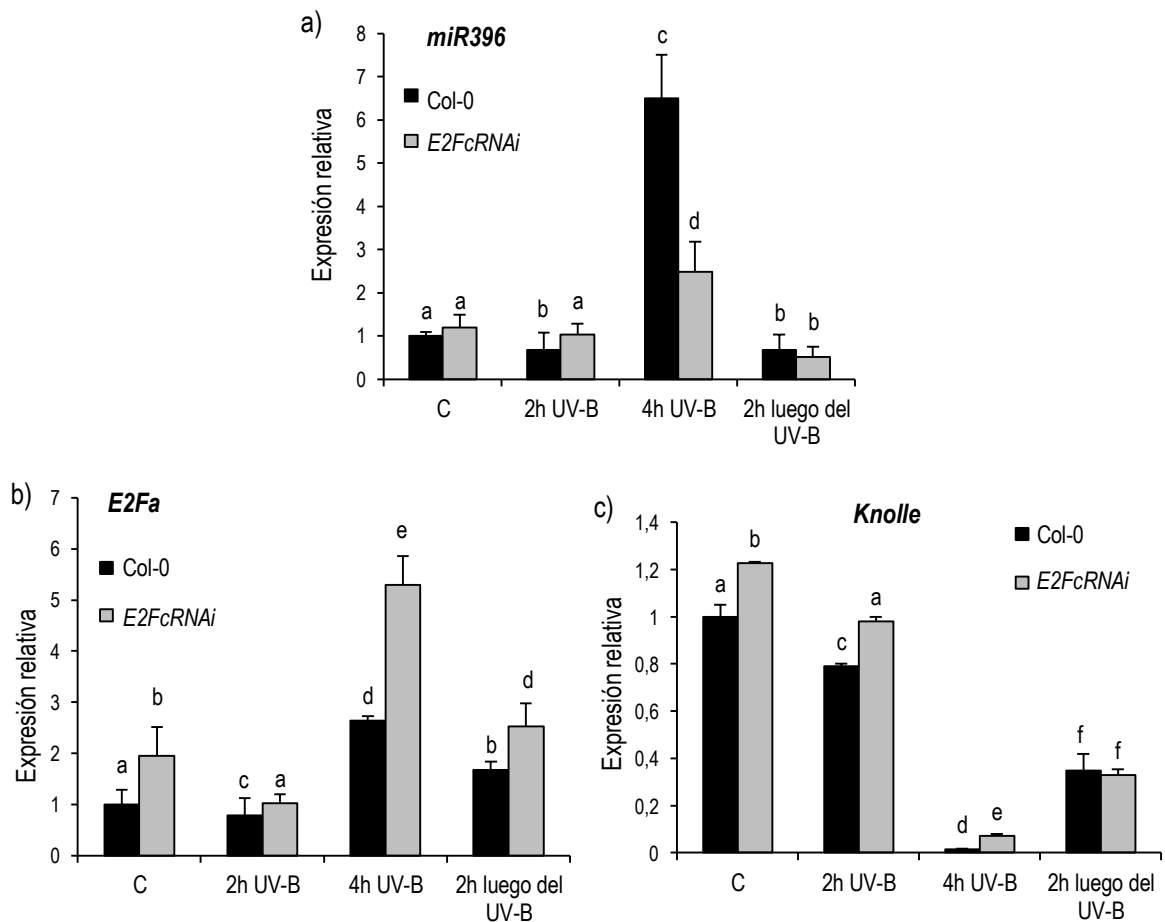




**Figura 3.8.** Análisis de la expresión de los genes a) *E2Fa*, b) *E2Fb*, c) *E2Fd*, d) *E2Fe*, e) *E2Ff*, f) *DPa* y g) *DPb*, los cuales codifican para proteínas pertenecientes a la vía del Retinoblastoma. Las medidas se realizaron por RT-qPCR, utilizando como material de partida las hojas #5 de plántulas de 12 días de la línea salvaje y de la línea transgénica *E2FcRNAi*, recolectadas al finalizar el tratamiento con UV-B o el tratamiento control. Las barras representan el promedio de la expresión génica, relativizado al promedio obtenido para la muestra salvaje Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos obtenidos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar, y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.9.** Efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de los transcritos a) *H4*, b) *Knolle*, c) *CDKB1;2*, d) *GRF2*, e) *GRF3* y f) *miR396*, en las hojas #5 de plántulas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi* de 12 días. Las medidas se realizaron por RT-qPCR, utilizando como gen normalizador *CPK3*. Las barras representan el promedio de la expresión génica, relativizada al promedio de la expresión en la muestra salvaje Col-0 en condiciones control. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.10.** Efecto de la radiación UV-B sobre los niveles de expresión de a) *miR396*, b) *E2Fa* y c) *Knolle* en la hoja #5 de plántulas de 12 días de las líneas salvaje Col-0 y *E2FcRNAi*, luego de distintos tiempos de exposición al UV-B. Los niveles de los transcritos fueron determinados por RT-qPCR, utilizando como gen normalizador *CPK3*. Las muestras fueron recolectadas luego de 4 h de iluminación en condiciones control (C), después de 2 h o 4 h de exposición a radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ), o luego de 2 h de permanecer bajo luz blanca, desde el momento en que finalizó el tratamiento de 4 h de exposición al UV-B. Las barras representan el promedio de la expresión génica relativo al promedio de la muestra salvaje Col-0 en condiciones control. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.2.2.1.3. Los niveles de ploidía en las hojas #5 de plantas *E2FcRNAi* no se modifican por la exposición al UV-B.

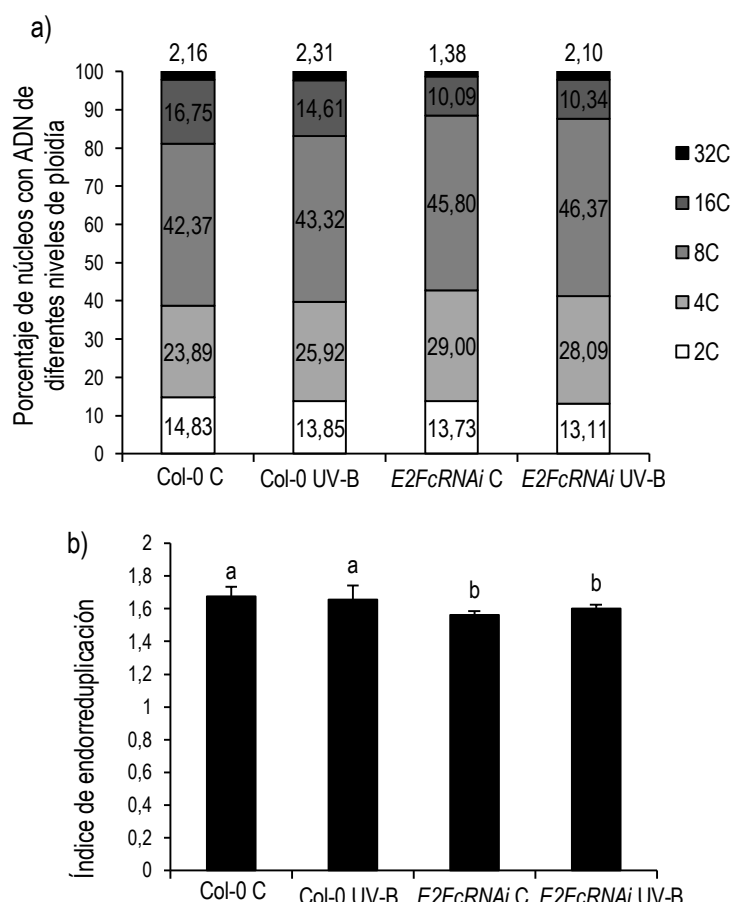
El endociclo es un ciclo celular alternativo, en el cual la mitosis y la citocinesis son omitidas pero la replicación del ADN continúa, lo que resulta en un incremento en el nivel de ploidía celular (Lammens y col., 2008; Lee y col., 2009; Breuer y col., 2014). Diversas funciones se le han asignado a este proceso, aunque su rol no está del todo claro. Una hipótesis es que funcionaría como una forma adaptativa de crecimiento frente a condiciones ambientales hostiles (De Veylder y col., 2011; Rymen y Sugimoto, 2012).

Dentro de las múltiples proteínas que participan en el control del endociclo, están los factores de transcripción E2F. En particular, E2Fe regula negativamente el comienzo del endociclo y la expresión del gen *UVR2*. Radziejewski y colaboradores (2011) demostraron que plantas con expresión disminuida de *E2Fe* (*E2Fc<sup>K0</sup>*) presentan una menor inhibición en el crecimiento de las hojas expuestas al UV-B que las plantas salvajes, y además acumulan menores niveles de DPCs en el ADN, debido a que poseen una mayor expresión del gen *UVR2*. Así mismo, al analizar las células de las hojas #5, determinaron que las plantas mutantes presentan mayor cantidad de células con altos niveles de ploidía que las plantas salvajes. Por otro lado, el fenotipo opuesto fue observado en plantas que sobre-expresan *E2Fe*.

En lo que respecta a E2Fc, se ha reportado que actúa como un regulador negativo de la expresión de *E2Fe* (Berckmans y col., 2011), y que cumple un rol importante como activador de la transición del ciclo celular mitótico hacia el endociclo. Esto fue demostrado por del Pozo y colaboradores (2006), que analizaron los núcleos de las plantas *E2FcRNAi*, determinando que los mismos contienen ADN con menores niveles de ploidía que los de las plantas salvajes, lo que indica que E2Fc es necesario para iniciar el proceso de endorreducción.

Por ello, para profundizar la caracterización de las respuestas de las plantas *E2FcRNAi* al UV-B, se realizaron experimentos de citometría de flujo como se detalla en la sección 2.12 de Materiales y Métodos. Como material de partida se utilizaron las hojas #5 completamente desarrolladas de plantas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi*, crecidas en condiciones control o irradiadas con UV-B a los 12 días posteriores a la estratificación, momento en el que estas hojas estaban comenzando a formarse. Se utilizaron las hojas maduras debido a que reflejan los cambios acumulados a lo largo del crecimiento.

En la Figura 3.11a se representa el porcentaje de núcleos que contienen ADN con diferentes niveles de ploidía, para las dos líneas en estudio y en las dos condiciones ensayadas. La sigla 2C hace referencia a los núcleos con genoma diploide y 4C a los núcleos que replicaron su ADN pero no se dividieron y como consecuencia, tienen el doble del contenido de ADN inicial, es decir que sufrieron una vez el proceso de endorreducción. Lo mismo sucede con los núcleos correspondientes a 8C, los cuales tienen cuatro veces la cantidad de ADN inicial, y los núcleos 16C y 32C que han atravesado 4 y 5 ciclos de endorreducción, respectivamente. Tanto las hojas de las plantas salvajes como las de la línea transgénica no muestran cambios en el porcentaje de núcleos con diferentes niveles de ploidía, entre la condición control y la de exposición a la radiación UV-B. Sin embargo, se observó que las hojas #5 de las plantas *E2FcRNAi* presentan menor porcentaje de núcleos con niveles de ploidía elevados (16C y 32C), como había sido reportado previamente (del Pozo y col., 2006). Esta diferencia se muestra en el gráfico de la Figura 3.11b, en el que se representa el índice de endorreducción para la línea salvaje Col-0 y la línea *E2FcRNAi*, en condiciones control y de irradiación con UV-B, al aplicar la fórmula descrita en la sección 2.12 de Materiales y Métodos.

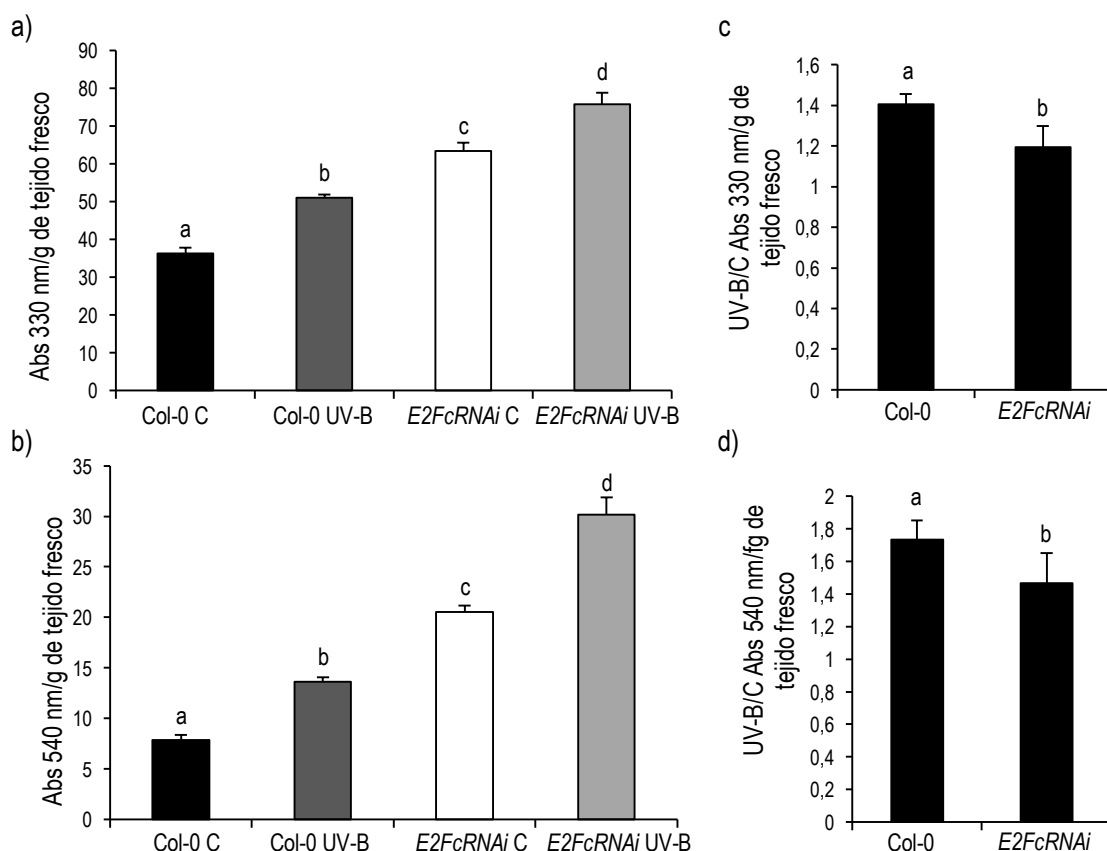


**Figura 3.11.** a) Porcentaje de núcleos que contienen ADN con distintos niveles de ploidía (2C, 4C, 8C, 16C, 32C) en las hojas #5 completamente desarrolladas de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Índice de endorreduplicación de las hojas #5 de las plantas salvajes y transgénicas *E2FcRNAi*, tratadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. Las barras representan el promedio de triplicados biológicos y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.1.4. Determinación del contenido de flavonoides y análisis de la expresión de genes involucrados en su síntesis en las plantas *E2FcRNAi*.

Las plantas poseen una gran variedad de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides. Estos compuestos fenólicos cumplen diversas funciones biológicas, tales como proteger a las plantas de la radiación UV-B y disipar las EROs (Winkel-Shirley, 2002; Falcone Ferreyra y col., 2012). El aumento del contenido de flavonoides es uno de los mecanismos de defensa más importante para las plantas en respuesta a la radiación UV-B (Chen y col., 2014). Además, se ha demostrado que las plantas mutantes en la vía de síntesis de los flavonoides muestran elevada sensibilidad a la radiación UV-B (Li y col., 1993; Landry y col., 1995).

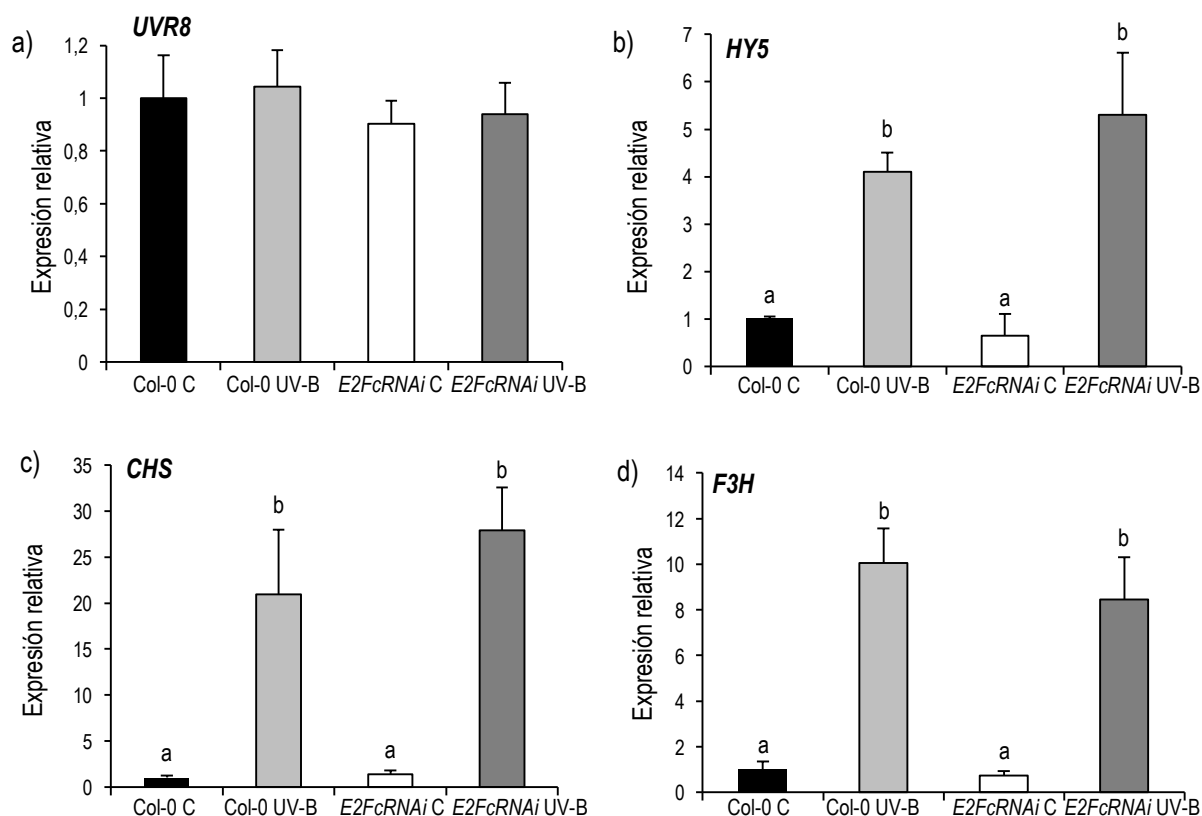
Por lo tanto, se determinó el contenido de flavonoides totales y antocianinas, un subgrupo de los flavonoides, como se describe en la sección 2.14 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que, tanto en condiciones control como luego de la exposición a la radiación UV-B por 4 h, las plantas *E2FcRNAi* acumulan mayor cantidad de flavonoides y antocianinas en las hojas, en comparación a las plantas salvajes Col-0 (Figura 3.12a y b). Sin embargo, al relativizar las medidas obtenidas en condiciones de iluminación con UV-B con respecto a las obtenidas en condiciones control en cada genotipo, se observa que la inducción de la producción de compuestos fenólicos es levemente mayor en la línea salvaje con respecto a la línea transgénica (Figura 3.12c y d). Por lo tanto, si bien las plántulas *E2FcRNAi* presentan mayor contenido de estos metabolitos secundarios en las dos condiciones ensayadas, el incremento en el contenido de los mismos causado por la radiación UV-B es levemente menor que en las plantas salvajes.



**Figura 3.12.** Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en las hojas de plántulas de 12 días de las líneas salvaje Col-0 y transgénica *E2FcRNAi*. a) El contenido de flavonoides totales se expresa como absorbancia a 330 nm por gramo de tejido fresco. b) El contenido de antocianinas se expresa como absorbancia a 540 nm por gramo de tejido fresco. Las barras representan el promedio de seis medidas obtenidas a partir de grupos de hojas provenientes de plántulas de 12 días, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. En c) y d) se representa el promedio de la relación UV-B/C para cada genotipo, correspondiente a los flavonoides totales y a las antocianinas, respectivamente. Las barras de error corresponden al error estándar, y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Para investigar a nivel molecular lo reportado fenotípicamente, se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de expresión de distintos genes que participan en la vía de señalización inducida por la radiación UV-B dependiente del fotorreceptor UVR8, y también de genes implicados en la biosíntesis y regulación de los flavonoides. En primer lugar, se determinaron los niveles de los transcritos *UVR8* y *HY5* en plántulas de 12 días de la línea salvaje Col-0 y de la línea transgénica *E2FcRNAi*. Como se detalla en la introducción, UVR8 es el único fotorreceptor de luz UV-B descrito hasta el momento. Luego de su translocación al núcleo, se asocia con COP1, con el fin de regular la expresión de diferentes genes, entre los que se encuentra *HY5*. Este gen codifica para un factor de transcripción que modula la expresión de diversos genes de respuesta a la radiación UV-B (Favory y col., 2009; Heijde y Ulm, 2012; Heijde y Ulm, 2013). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de *UVR8* no se modifica por la presencia de luz UV-B, siendo similares los niveles de los transcritos entre los genotipos analizados. Sin embargo, hay un incremento en los niveles de transcritos *HY5* en las plántulas que fueron expuestas al UV-B en comparación a los niveles obtenidos en condiciones control, siendo los mismos similares entre las líneas Col-0 y *E2FcRNAi* (Figura 3.13a y b).

En segundo lugar, se analizó la expresión de los genes *CHS* y *F3H*, que codifican para la enzima chalcona sintasa y flavanona 3-hidroxilasa, respectivamente, ambas involucradas en la síntesis de flavonoides. Si bien los niveles de los transcritos aumentan luego de la exposición de las plantas al UV-B, no se observan diferencias significativas entre las dos líneas en estudio (Figura 3.13c y d). Por lo tanto, la menor inhibición en el crecimiento de las hojas de las plantas *E2FcRNAi* con respecto a las hojas de las plantas salvajes expuestas al UV-B, sería independiente de la activación de vías de señalización mediadas por UVR8 y HY5, y de la acumulación diferencial de pigmentos protectores.



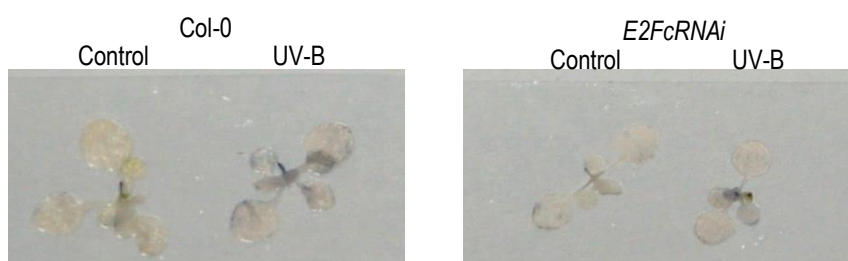
**Figura 3.13.** Análisis de la expresión de genes de respuesta a la radiación UV-B en plántulas salvaje Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi* mediante experimentos de RT-qPCR. Se determinaron los niveles de los transcritos de a) *UVR8*, b) *HY5*, c) *CHS* y d) *F3H*, en plántulas Col-0 y *E2FcRNAi* expuestas a la radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. Las barras representan los promedios de expresión obtenidos, relativizados al promedio de la expresión en las plantas salvaje Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.1.5. Determinación del contenido del anión superóxido en las plantas *E2FcRNAi*.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) comprenden distintas especies radicales, los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), perhidroxilo ( $HO_2^\cdot$ ) y alcoxilo ( $RO^\cdot$ ); y no radicales, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). En los cloroplastos, los fotosistemas I y II son los principales sitios de producción de  $^1O_2$  y  $O_2^-$ ; y en las mitocondrias, los complejos de la cadena de transporte de electrones son los mayores productores de  $O_2^-$ . Las EROs son especies altamente reactivas y tóxicas que causan daño a las proteínas, los lípidos, los carbohidratos, el ADN, y en última instancia producen la muerte celular (Gill y Tuteja, 2010). El equilibrio entre la producción y eliminación de las EROs puede ser alterada por estrés del tipo biótico y abiótico, entre los que se encuentra la radiación UV-B (Gill y Tuteja, 2010).



En particular, el anión superóxido es una de las EROs más importantes debido a que, a través de una serie de reacciones, puede transformarse en  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$ , entre otras formas de EROs, resultando muy tóxico para las células (Gill y Tuteja, 2010). Por lo tanto, se analizaron cualitativamente los niveles del anión superóxido como se detalla en la sección 2.15 de Materiales y Métodos, en plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi* de 12 días, mantenidas en condiciones control y expuestas a la radiación UV-B. En condición control en ausencia de UV-B, las plantas de los dos genotipos en estudio muestran una leve coloración azulada, indicando que los niveles de  $\text{O}_2^-$  son bajos en esta condición. Luego de la exposición al UV-B, tanto las plantas salvajes como las transgénicas exhiben una mayor coloración azulada, indicando que los niveles de  $\text{O}_2^-$  aumentan luego del tratamiento con UV-B (Figura 3.14). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en la tinción entre las plántulas salvaje Col-0 y las *E2FcRNAi*, sugiriendo que la respuesta a la radiación UV-B mediada por el factor de transcripción E2Fc es independiente del estado oxidativo de las células.



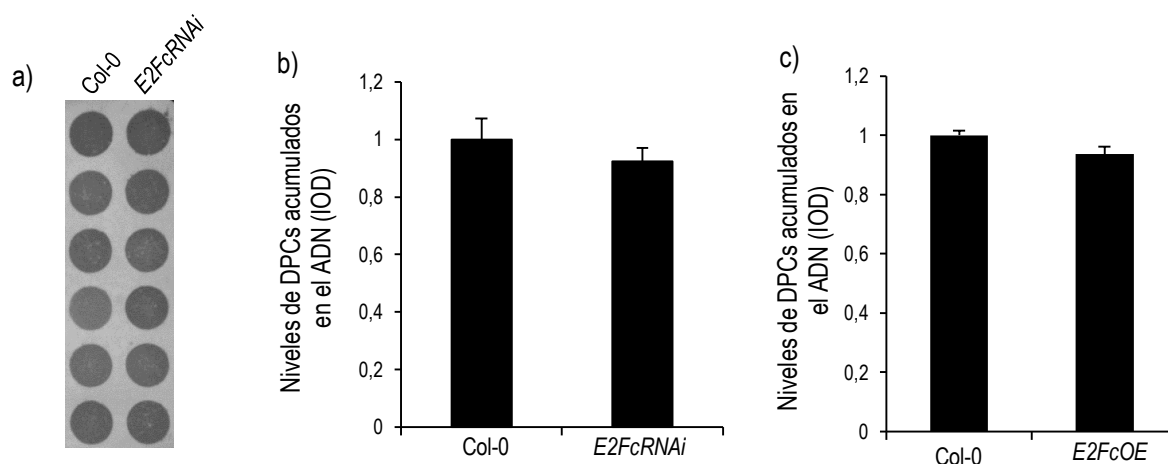
**Figura 3.14.** Ejemplos representativos de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi* de 12 días, teñidas con NBT una vez finalizados los tratamientos con radiación UV-B por 4 horas o en condiciones control. La coloración azul oscuro indica la presencia del anión superóxido. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.1.6. Las plantas transgénicas *E2FcRNAi* y *E2FcOE* acumulan niveles similares de daño en el ADN luego de la exposición al UV-B.

Como fue descrito en la Introducción, la radiación UV-B produce daño directo en el ADN al inducir la formación de dímeros de pirimidina (DPCs), siendo éste el tipo de lesión predominante que produce el UV-B. Debido a que los factores de transcripción E2Fb y E2Fc regulan la expresión de *E2Fe* (Berckmans y col., 2011), y a que Radziejwoski y colaboradores (2011) determinaron que las plantas mutantes *E2Fe<sup>KO</sup>* acumulan menores niveles de DPCs en su ADN luego de la exposición al UV-B, debido a que presentan incrementados los niveles de expresión del transcripto *UVR2*, analizamos la acumulación de DPCs en el ADN de plantas *E2FcRNAi* y *E2FcOE*, con el fin de determinar si el fenotipo observado en las plantas *E2Fe<sup>KO</sup>* es regulado por E2Fc.

Los ensayos de dot blot se realizaron utilizando anticuerpos anti-DPCs y las muestras se procesaron como se describe en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. En la Figura 3.15a se muestra un ejemplo de la membrana obtenida luego de ser revelada con anticuerpos específicos. En los gráficos

de las Figuras 3.15b y 3.15c, se representan los niveles de DPCs promedio acumulados en el ADN de las plantas transgénicas *E2FcRNAi* y *E2FcOE*, junto con los de las plantas salvajes Col-0, respectivamente. Los resultados muestran que no hay diferencias en la acumulación de DPCs en el ADN entre las líneas transgénicas con respecto a la línea salvaje luego de la exposición al UV-B.

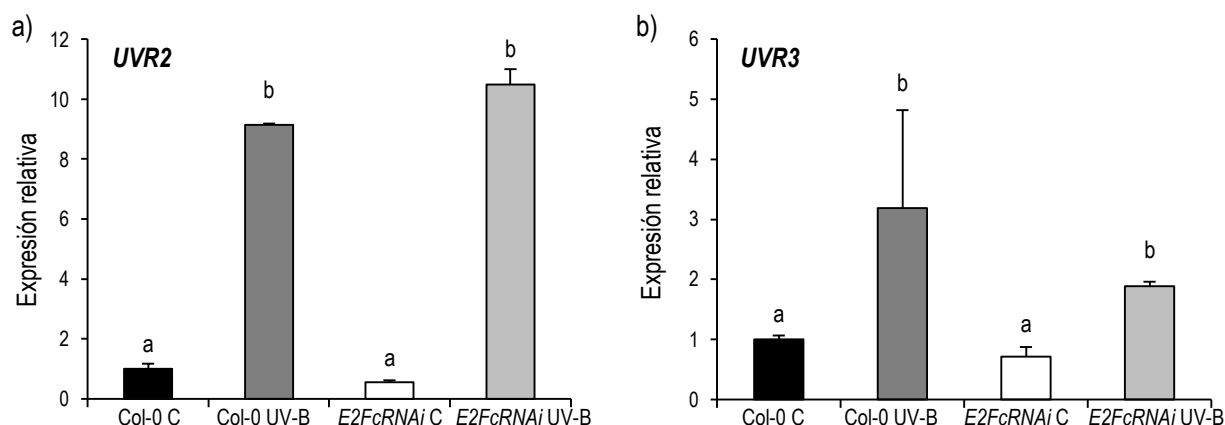


**Figura 3.15.** Cuantificación del daño en el ADN mediante ensayo de dot blot utilizando anticuerpos anti-DPCs. a) Membrana representativa de un ensayo de dot blot, en la que se sembró ADN extraído de plantas Col-0 y *E2FcRNAi* expuestas a la radiación UV-B por 4 h. b) Niveles promedio de DPCs acumulados en el ADN de plantas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi* luego de la exposición al UV-B. c) Niveles promedio de DPCs acumulados en el ADN de plantas salvajes Col-0 y *E2FcOE* luego de la exposición al UV-B. En ambos casos los resultados fueron obtenidos por densitometría (IOD, del inglés Integrated Optical Density). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas luego de aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ) entre cada una de las plantas transgénicas con respecto a las plantas salvajes. Las plantas Col-0, *E2FcRNAi* y *E2FcOE* sometidas al tratamiento control no presentaron daño cuantificable en el ADN. Las barras representan el promedio de 6 grupos de plántulas de 12 días, y las barras de error corresponden el error estándar. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Debido a que las plantas *E2FcRNAi* muestran una menor inhibición del crecimiento de la roseta cuando son expuestas a la radiación UV-B con respecto a las plantas salvajes Col-0, y con el objetivo de complementar los resultados obtenidos por los ensayos de dot blot, se analizó por RT-qPCR la expresión de los genes *UVR2* y *UVR3* en las hojas #5 de plántulas salvajes y transgénicas de 12 días, luego de ser expuestas a la radiación UV-B durante 4 h o de permanecer en condiciones control. Estos genes codifican para la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs, y para la enzima fotoliasa encargada de remover los (6-4) PPs, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que en condiciones control los niveles de los transcritos de *UVR2* y *UVR3* son bajos y similares en los dos genotipos analizados. En las plántulas que fueron expuestas a la radiación UV-B, se observa un aumento significativo en la expresión de estos genes, siendo el mismo similar entre la línea salvaje y la transgénica (Figura 3.16a y b). Por lo tanto, el fenotipo observado en las plantas *E2FcRNAi* es opuesto al descrito para las plantas mutantes *E2Fe<sup>KO</sup>*, las cuales son capaces de reparar más eficientemente

el ADN dañado que las plantas salvajes, e ingresar al endociclo más rápidamente (Radziejwoski y col., 2011).

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos al analizar las líneas transgénicas *E2FcRNAi* y *E2FcOE*, se concluye que el factor de transcripción E2Fc no participaría de las respuestas al UV-B mediadas por E2Fe, y que E2Fc no estaría involucrado en la regulación de los mecanismos de reparación del daño al ADN causado por la radiación UV-B.



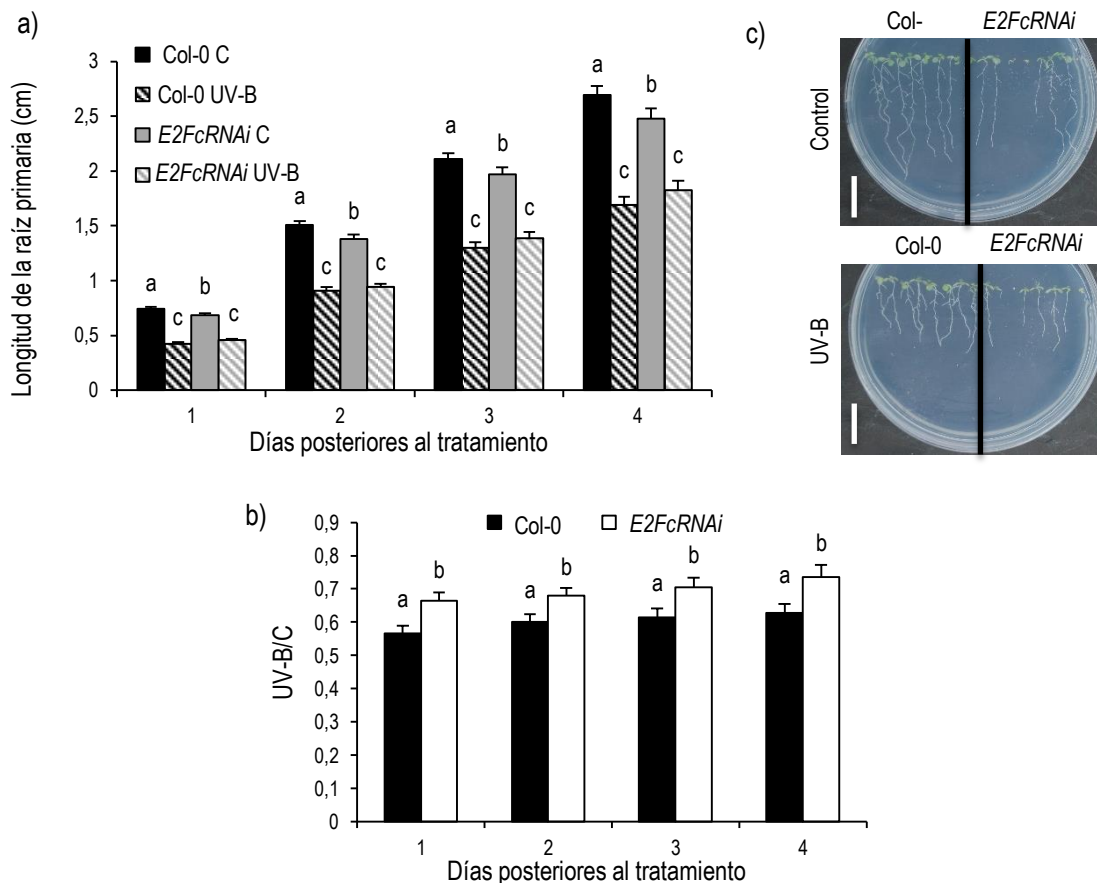
**Figura 3.16.** Determinación de los niveles de los transcritos de a) *UVR2* y b) *UVR3* en las hojas #5 de plántulas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi* mediante RT-qPCR. Las barras representan el promedio de los niveles de expresión relativizados al obtenido para la línea salvaje Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error representan el error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.2.2.1.7. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas *E2FcRNAi* y *E2FcOE*.

Experimentos realizados previamente por el grupo de trabajo mostraron que, cuando se irradian plántulas salvajes Col-0 de *Arabidopsis* con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 hora, se produce una marcada disminución en la elongación de la raíz primaria (Emiliani y col., 2013). Por lo tanto, se procedió a realizar dicha evaluación en las plantas transgénicas *E2FcRNAi* y *E2FcOE*. Para ello se sembraron semillas de los distintos genotipos en placas conteniendo MS-agar, y los experimentos de irradiación con UV-B se realizaron como se detalla en la sección 2.2 de Materiales y Métodos.

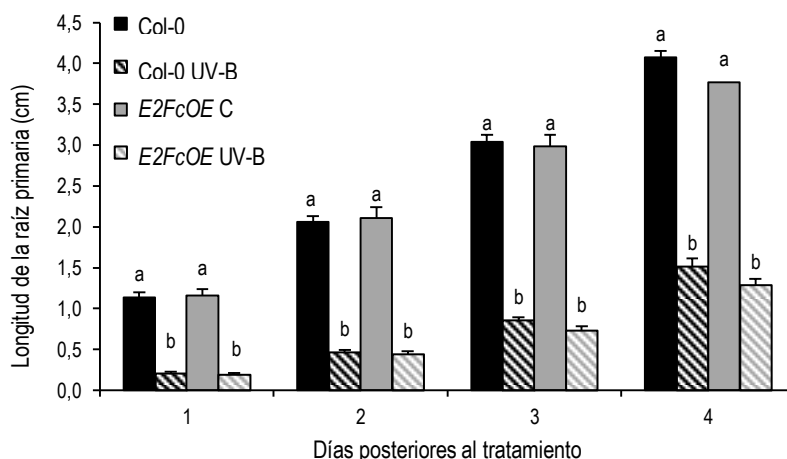
Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones control, las raíces de la línea transgénica *E2FcRNAi* son más cortas que las de la línea salvaje Col-0, mientras que un día después de haber finalizado el tratamiento con UV-B, la longitud de las raíces de ambas líneas es similar. Esta respuesta se mantiene durante los cuatros días posteriores al tratamiento con UV-B, por lo tanto, el crecimiento de las raíces de las plantas *E2FcRNAi* muestra una menor inhibición por el UV-B que el de las plantas

salvajes, siendo esto similar a lo descrito para la parte aérea de estas plantas (Figura 3.17a y b). En la Figura 3.17c se muestran fotografías de las plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi*, a los cuatro días posteriores a los tratamientos, en donde se puede apreciar el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de las raíces.



**Figura 3.17.** Análisis de la elongación de la raíz primaria luego del tratamiento control o con radiación UV-B. a) Se representa la longitud promedio de la raíz primaria de plantas salvajes Col-0 y de plantas transgénicas *E2FcRNAi* en función de los días posteriores a los tratamientos. Las barras representan el promedio de 30 raíces. b) Se representa la relación UV-B/C de la longitud de la raíz primaria para las dos líneas en estudio. En ambos gráficos las barras de error representan el error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografías de plántulas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi*, tomadas a los 4 días de haber sido expuestas al tratamiento con UV-B o de permanecer en condiciones control. Las barras de escala representan 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre la elongación de la raíz primaria en las plantas *E2FcOE*. En condiciones control, la raíz primaria de las plantas *E2FcOE* presenta, en promedio, una longitud similar a la de las plantas salvajes Col-0. Si bien se observa una marcada disminución en la elongación de la raíz primaria luego de realizado el tratamiento con UV-B, no se observan diferencias entre las dos líneas en estudio, en ninguno de los cuatro días posteriores al tratamiento (Figura 3.18).



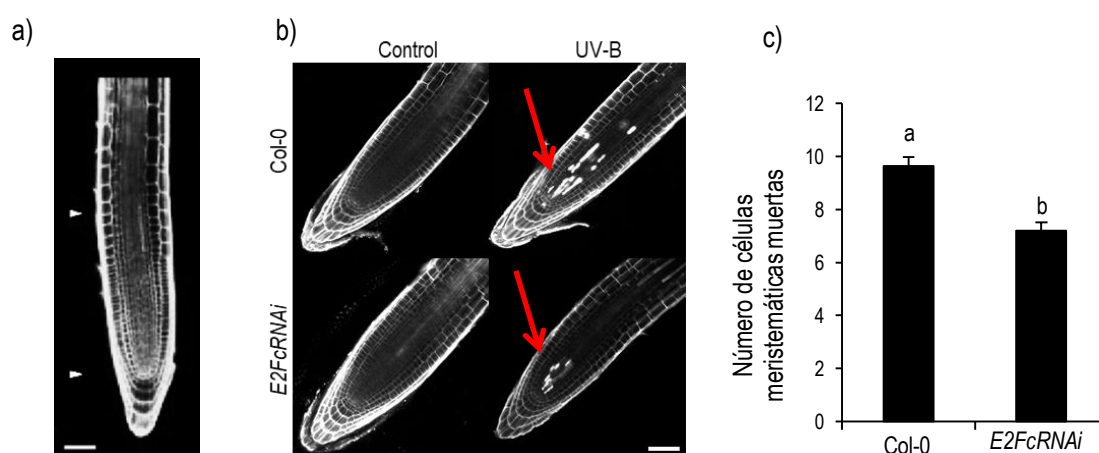
**Figura 3.18.** Análisis de la elongación de la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0 y *E2FcOE*, luego de ser expuestas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. Las barras representan la longitud promedio de la raíz primaria de 30 plantas, y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado obteniendo resultados similares.

Si bien las raíces de las plantas no están expuestas a la radiación UV-B, las mismas son un buen modelo para estudiar los efectos del daño en el ADN en tejidos en diferenciación y crecimiento. La velocidad de crecimiento de la raíz primaria depende, en gran parte, del número de células que se encuentran en división celular en el meristema. Éstas, a su vez, se generan por división de las células madre que rodean al centro quiescente, el cual se encuentra en la región cercana a la punta de la raíz (Curtis y Hays, 2007). La elevada radiación UV-B causa daño en el ADN, por lo que las células deben responder al mismo induciendo los mecanismos de reparación, y si el ADN no pudo ser reparado adecuadamente, deben ingresar al programa de muerte celular (Falcone Ferreyra y col., 2016). Por ello, para complementar la caracterización fenotípica de las raíces, se cuantificó el número de células muertas en el meristema luego de realizar el tratamiento con UV-B. Luego de 5 días de crecimiento en placas con MS-agar en posición vertical, las plantas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi* fueron expuestas al UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h, o mantenidas en condiciones control. Una vez finalizados los tratamientos, las placas permanecieron en oscuridad durante 24 h, y al día siguiente las raíces fueron teñidas con Ioduro de Propidio (IP), un colorante que tiñe las paredes de las células vivas y es absorbido completamente por las células muertas. A continuación, las raíces fueron fotografiadas utilizando un microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1), con un aumento de 40X, y las células muertas en la zona meristemática fueron contadas y registradas como el número de células meristemáticas muertas por raíz.

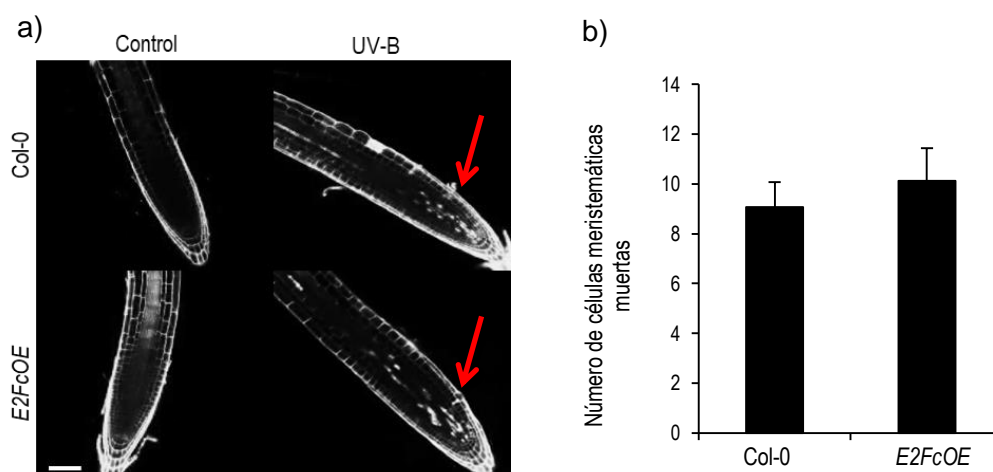
En la Figura 3.19a se muestra la arquitectura de la punta de la raíz de una plántula salvaje Col-0 de 7 días de crecimiento, y se indica con flechas la zona meristemática. Las fotografías de la Figura 3.19b

son ejemplos representativos de las imágenes tomadas en el microscopio, en donde se puede observar que las raíces que fueron sometidas al tratamiento control no poseen células meristemáticas muertas, mientras que sí hay células muertas en aquellas que fueron irradiadas con UV-B. El gráfico de la Figura 3.19c representa el número promedio de células meristemáticas muertas por raíz para las dos líneas en estudio. Los resultados indican que las raíces de las plantas *E2FcRNAi* poseen un menor número de células meristemáticas muertas que las plantas salvajes Col-0 luego del tratamiento con UV-B. De esta manera, el factor de transcripción E2Fc podría estar regulando la expresión de genes involucrados en el programa de muerte celular causadas por la radiación UV-B.

Por otro lado, al analizar el número de células meristemáticas muertas en las raíces de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcOE* expuestas al UV-B, no se observaron diferencias entre los genotipos (Figura 3.20). Por lo tanto, de manera similar a lo observado en las hojas, niveles elevados de *E2Fc* no producen un cambio en la respuesta de las raíces frente al UV-B, lo que sugiere que los niveles celulares de esta proteína ya serían suficientes para desencadenar la respuesta.



**Figura 3.19.** a) Imagen en la que se indica entre flechas la zona meristemática de la raíz de una planta salvaje Col-0, a los 7 días de crecimiento. La flecha en la parte inferior marca la posición del centro quiescente, mientras que la flecha en la parte superior marca el final de la zona meristemática. A partir de allí las células dejan de dividirse y comienzan a elongarse. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Adaptado de Ercoli y colaboradores (2018). b) Fotografías de raíces en condiciones control o tratadas con UV-B durante 1 h, ambas teñidas con IP, que fueron tomadas con un microscopio confocal. Las regiones totalmente coloreadas, indicadas con flechas, corresponden a las células muertas. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. c) Gráfico que representa el número promedio de células meristemáticas muertas por raíz en la línea salvaje Col-0 y en la línea transgénica *E2FcRNAi*. Las barras representan el promedio obtenido a partir del análisis de 40 raíces, y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba estadística t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.20.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre las células del meristema radicular de plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcOE*. a) Fotografías tomadas con el microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) de raíces en condición control o tratadas con UV-B durante 1 h, luego de ser teñidas con Ioduro de Propidio. Las regiones totalmente coloreadas corresponden a las células muertas y se encuentran indicadas con flechas. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. b) Gráfico que representa el número promedio de células meristemáticas muertas por raíz para la línea salvaje Col-0 y la línea transgénica *E2FcOE*. Las barras representan el promedio de 40 raíces analizadas y las barras de error corresponden al error estándar. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas al aplicar la prueba estadística t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniendo resultados similares.

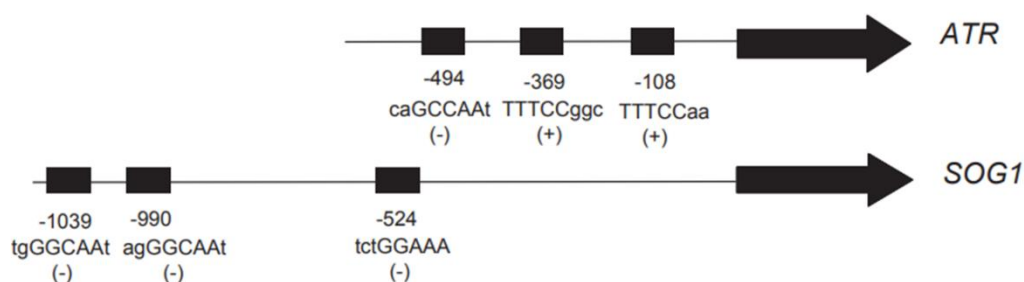
#### 3.2.2.1.8. E2Fc participa en la regulación de la expresión de genes de la vía de “Respuesta frente al daño en el ADN”.

En *A. thaliana*, el daño en el ADN causado por UV-B induce la muerte celular de las células madre presentes en los meristemas apical y radicular de manera dependiente de ATM y/o ATR (Fulcher y Sablowski., 2009; Yoshiyama y col., 2013a; González Besteiro y Ulm, 2013). Particularmente en las raíces, ambas proteínas quinasas activan al factor de transcripción SOG1, el cual a su vez regula efectores de la muerte celular en respuesta a la radiación UV-B (Furukawa y col., 2010).

En base a lo reportado en la bibliografía y a los resultados obtenidos, en primer lugar, se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes *ATR*, *ATM*, y *SOG1*. Para esto, mediante la utilización del software PlantPAN2.0 (<http://plantpan2.its.ncku.edu.tw/>), y conociendo el sitio consenso de unión para los factores de transcripción E2F (TTTCCCGCC; Vandepoele y col., 2005), se determinó que los promotores de *ATR* y *SOG1* poseen sitios de unión putativos para esta clase de factores de transcripción (Figura 3.21).

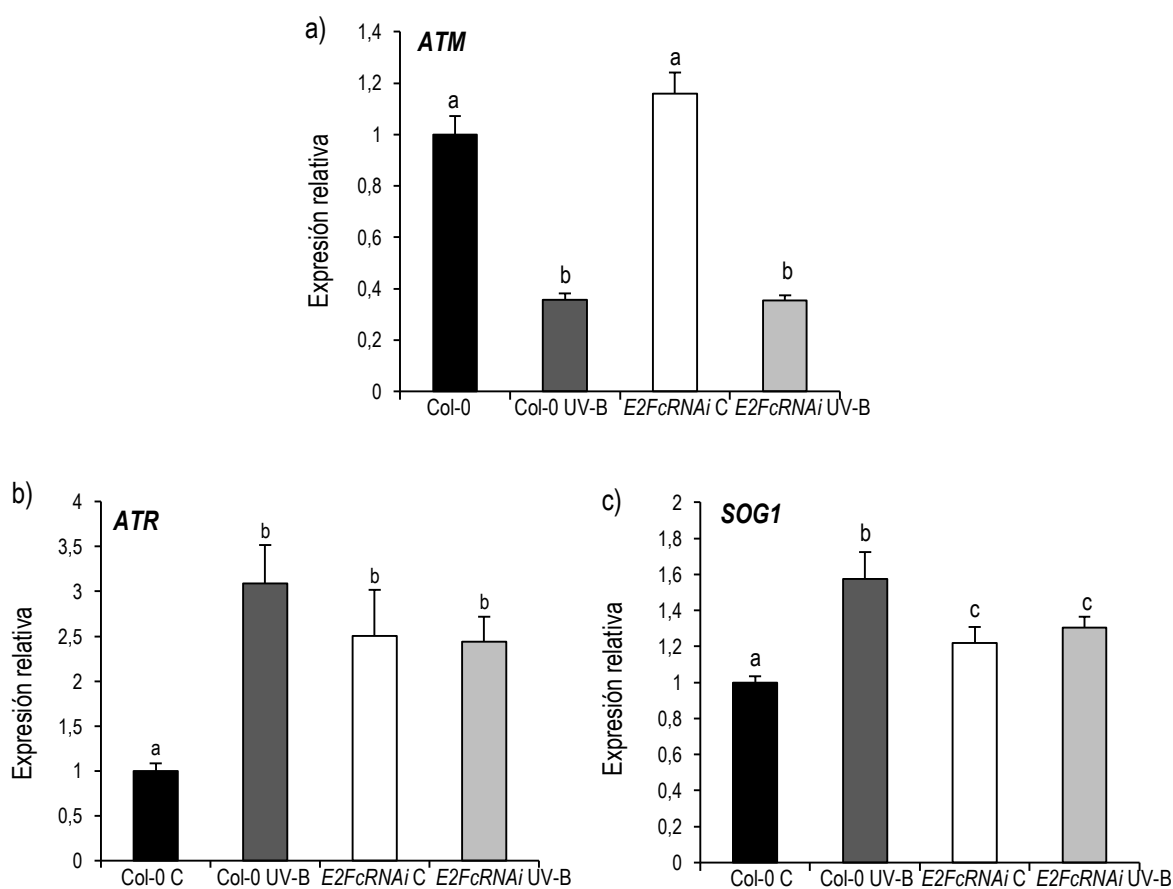
En segundo lugar, se analizó la expresión de los genes que codifican para las quinasas ATM y ATR, y para el factor de transcripción SOG1, por ensayos de RT-qPCR, con el fin de investigar si el fenotipo de muerte celular programada observado en las plántulas *E2FcRNAi* se asocia con alteraciones en la

expresión de dichos genes. En la Figura 3.22 se representan los valores promedio de estos transcritos en las hojas #5 de plántulas salvajes Col-0 y *E2FcRNAi*, en condiciones control o luego de la exposición a la radiación UV-B por 4 h. Si bien los niveles de *ATM* disminuyen en respuesta a la radiación UV-B, no hay diferencias en su expresión entre las plantas salvajes y las transgénicas, en ninguna de las dos condiciones ensayadas. Sin embargo, en la condición control la línea *E2FcRNAi* posee mayores niveles de los transcritos *ATR* y *SOG1* que la línea salvaje Col-0, mientras que, en aquellas plántulas irradiadas con UV-B, los niveles de los transcritos no cambian en la línea transgénica, mientras que aumentan en la línea salvaje. Aunque la unión directa de E2Fc a las regiones promotoras aún debe ser validada, es posible que *ATR* y *SOG1* sean blancos directos de este factor de transcripción, y por lo tanto, E2Fc cumpla un rol central en la respuesta frente al daño al ADN causado por la radiación UV-B.



**Figura 3.21.** Esquema de los promotores proximales de *ATR* y *SOG1*. Se muestran las secuencias correspondientes a los sitios consenso putativos de unión para E2F (cuadrados en negro) y sus posiciones con números en la parte inferior. El codón ATG de comienzo de la traducción corresponde al +1 y las flechas representan las regiones codificantes de *ATR* y *SOG1*. Las secuencias consenso presentes en la hebra codificante están indicadas con un signo (+), mientras que aquellas que se encuentran en la hebra no codificante están indicadas con un signo (-).





**Figura 3.22.** Análisis de los niveles de los transcritos de los genes a) *ATM*, b) *ATR*, y c) *SOG1* en las hojas #5 de plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FcRNAi* irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control. Los niveles de los transcritos se analizaron mediante RT-qPCR, utilizando para la normalización de los datos el gen *CPK3*. Las barras representan el promedio de la expresión relativizado al promedio obtenido para la línea salvaje Col-0 en condiciones control. Las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### **3.2.2.2. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan expresión disminuida del microARN 396 (*MIM396*).**

Además de la vía del Retinoblastoma, en la que algunos de sus miembros participan en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a la radiación UV-B y el desarrollo de las plantas, existe otra vía que también cumple un rol fundamental en estos procesos, la vía del microARN 396 y los factores de transcripción de la familia GRF.

Estudios previos realizados por el grupo de trabajo demostraron que la radiación UV-B induce la expresión del *miR396* en hojas en desarrollo, lo que conlleva a la disminución en la expresión de los factores de transcripción *GRF1*, 2 y 3. Como consecuencia, se produce una disminución en el desarrollo de la roseta debido a la inhibición de la proliferación celular (Casadevall y col., 2013). Para dicho trabajo se utilizó la línea transgénica *MIM396*, que presenta expresión disminuida del *miR396* por la tecnología del target mimicry, como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Luego de exponer las plantas salvajes y las transgénicas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h y de evaluar su crecimiento vegetativo, se determinó que las plantas *MIM396* muestran una menor inhibición del crecimiento que las plantas salvajes Col-0. Cuando se realizó el análisis microscópico de las hojas #5, que se encontraban en el inicio del desarrollo en el momento en el que se realizaron los tratamientos, se observó que el área celular no se modifica por la exposición al UV-B, pero que las plantas salvajes presentan una mayor inhibición de la proliferación celular que las plantas transgénicas luego de tratamiento.

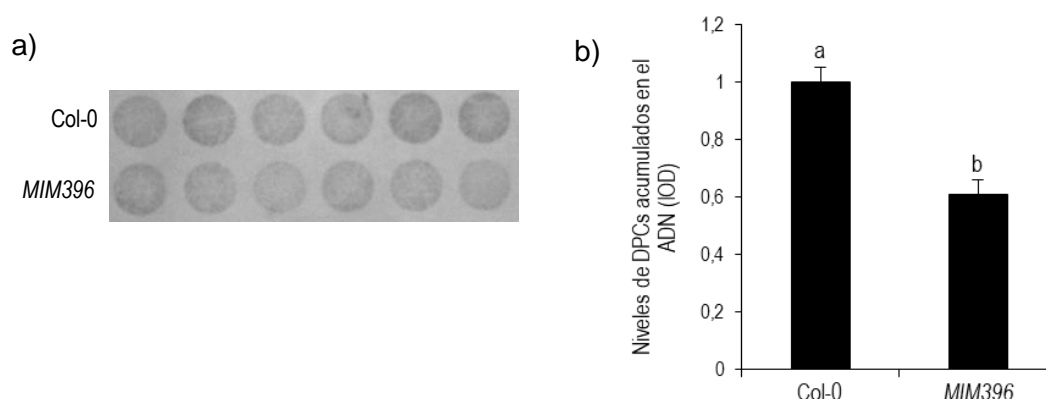
A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que la marcada disminución en la expresión del *miR396* que presentan las plantas *MIM396* permite que los niveles de expresión de los *GRFs* se mantengan elevados en estas plantas luego de ser irradiadas con UV-B, lo que genera como consecuencia una menor inhibición del crecimiento y de la proliferación celular (Casadevall y col., 2013). Más detalles sobre esta vía, así como un esquema que explica este mecanismo, se encuentran en la sección 1.4.2 de la Introducción.

Con el fin de continuar con la caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en las plantas de la línea *MIM396*, se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

#### **3.2.2.2.1. Las plantas transgénicas *MIM396* acumulan menor cantidad de daño en el ADN luego de la exposición al UV-B.**

En primer lugar, para continuar con el estudio de la respuesta a la radiación UV-B en la parte aérea de las plantas *MIM396*, se determinó la acumulación del daño en el ADN mediante ensayos de dot blot, utilizando anticuerpos anti-DPCs. Si bien las plantas que permanecieron en condiciones control no

muestran niveles de DPCs cuantificables; luego del tratamiento con UV-B, las plantas *MIM396* presentan menor acumulación de daño en el ADN que las plantas salvajes Col-0 (Figura 3.23).

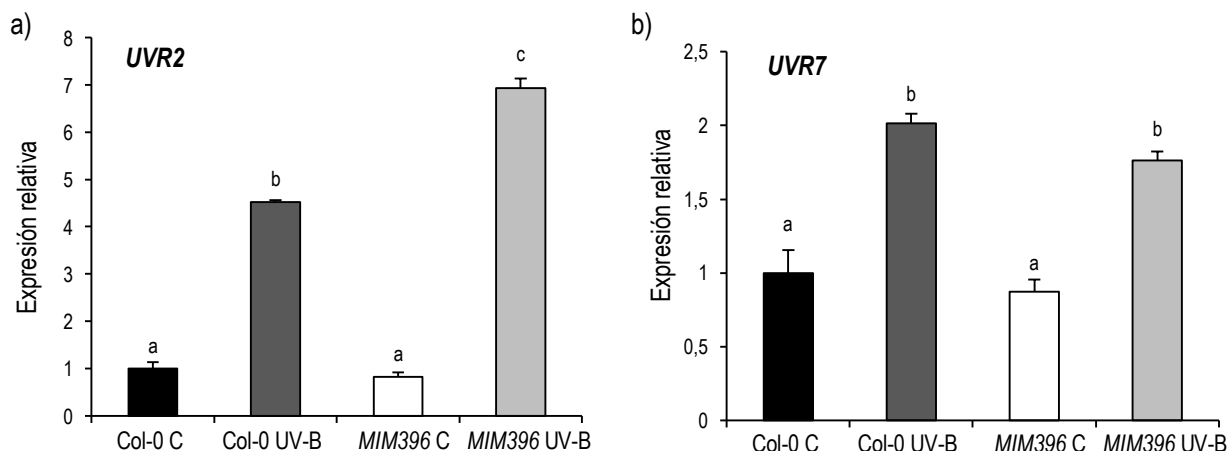


**Figura 3.23.** Cuantificación de los niveles de DPCs acumulados en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B por 4 h. a) Membrana correspondiente a un ensayo de dot blot en el que se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-DPCs y se sembró ADN proveniente de 6 grupos de plantas de cada genotipo. Sólo las muestras irradiadas con UV-B se muestran en la imagen, ya que las muestras provenientes de plantas que permanecieron en condiciones control no presentaron daño cuantificable. b) Las barras representan los niveles promedio de DPCs acumulados en el ADN de hojas de plantas salvajes Col-0 y de plantas transgénicas *MIM396* determinados por densitometría (IOD, del inglés Integrated Optical Density). Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado obteniendo resultados similares.

En segundo lugar, y con el objetivo de determinar si la menor acumulación del daño en el ADN en las plantas *MIM396* se correspondía con cambios en la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la reparación de los fotoproductos, se realizaron ensayos de RT-qPCR en los que se analizó la expresión de los genes *UVR2* y *UVR7*. Para esto, previamente se extrajo el ARN total de plántulas salvajes Col-0 y *MIM396* que fueron irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control a los 12 días de crecimiento.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles del transcripto *UVR2*, son similares entre las plantas transgénicas y las plantas salvajes en condiciones control, es decir en ausencia de UV-B. Sin embargo, luego de la exposición a la radiación UV-B, ambas líneas muestran un aumento significativo en la expresión de este gen, siendo este mayor en las plantas *MIM396* que en las plantas salvajes Col-0 (Figura 3.24a). Por otro lado, cuando se cuantificaron los niveles de *UVR7*, que codifica para una enzima que participa en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), los resultados mostraron que en condiciones control, la expresión de este transcripto es similar en las dos líneas en estudio; y si bien luego de la exposición al UV-B la expresión de este gen aumenta significativamente, no se detectaron diferencias entre las plantas *MIM396* y las plantas salvajes Col-0 (Figura 3.24b). Por lo tanto, es posible que la menor acumulación del daño en el ADN en las hojas de las plantas *MIM396*

se deba al aumento en la expresión del gen que codifica para la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs.



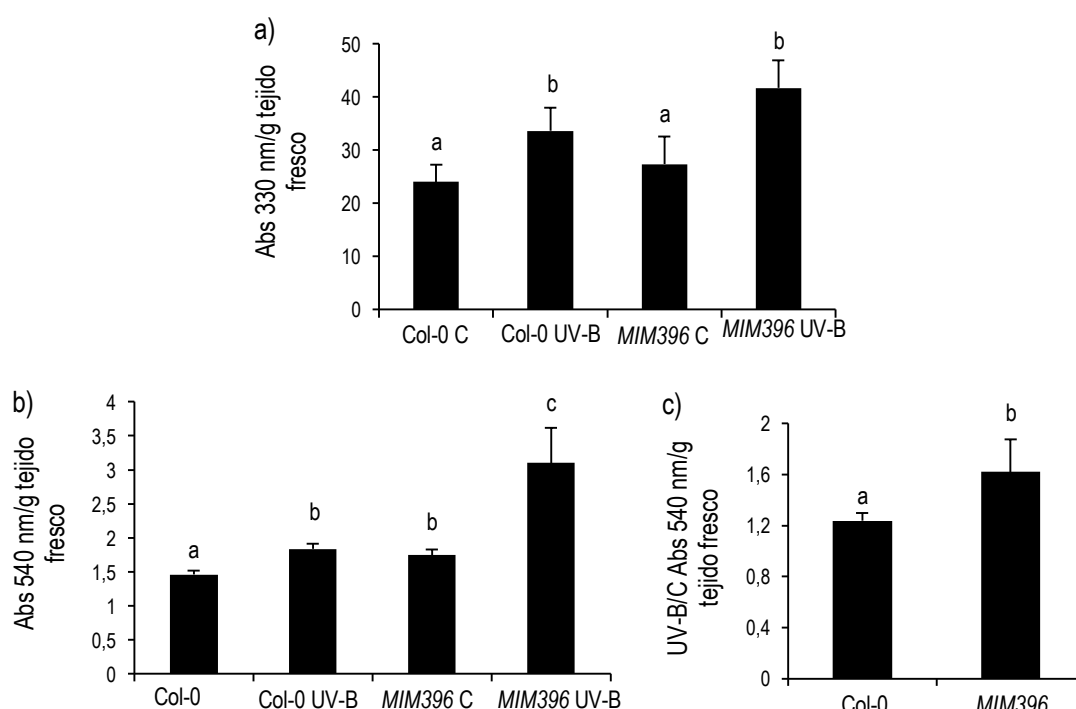
**Figura 3.24.** Análisis de la expresión de los genes a) *UVR2* y b) *UVR7* mediante RT-qPCR en hojas de plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396*, expuestas a la radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En los gráficos se representan los niveles promedio de la expresión de cada gen, relativizados a las medidas obtenidas en las plántulas salvajes Col-0 que permanecieron en condiciones control. Se utilizó como gen normalizador *CPK3*. Las barras de error representan el error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.2.2. Determinación del contenido de flavonoides totales y de la acumulación del anión superóxido en las plantas *MIM396*.

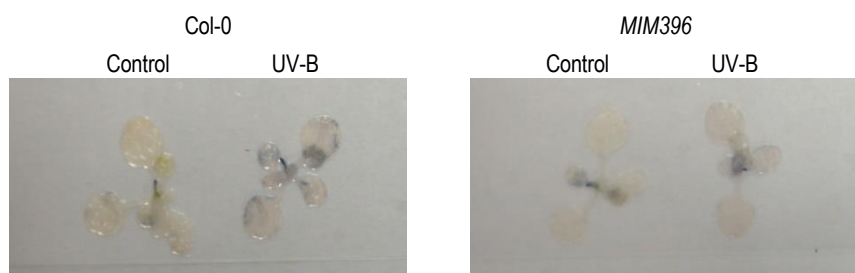
Luego, se procedió a cuantificar la acumulación de flavonoides y antocianinas en plantas de 12 días, inmediatamente luego de finalizado el tratamiento control o con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de flavonoides totales son mayores en las plantas que fueron expuestas al UV-B que en las que permanecieron en condiciones control; no obstante, no se observaron diferencias entre las plantas salvajes Col-0 y las transgénicas *MIM396* en ninguna de las dos condiciones ensayadas. Sin embargo, cuando se midió el contenido de antocianinas, un subgrupo de los flavonoides, se determinó que las plantas *MIM396* acumulan mayor cantidad de estos compuestos en condiciones control que las plantas salvajes. Además, luego de la irradiación con UV-B, se observó un aumento en la acumulación de los mismos, siendo ésta también mayor en la línea transgénica que en la línea salvaje (Figura 3.25).

A continuación, se analizó cualitativamente la acumulación del anión superóxido. En las plantas que fueron expuestas a la radiación UV-B, se observa una mayor acumulación del precipitado azul intracelular que en las plantas que permanecieron en condiciones control. A su vez, las plantas *MIM396* tratadas con UV-B presentan una menor coloración que las plantas salvajes bajo la misma condición (Figura 3.26). Por lo tanto, las plantas de la línea transgénica *MIM396* acumularían una menor cantidad

de anión superóxido que las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B. Esto puede atribuirse, en parte, a la mayor acumulación de antocianinas, pero también podría ocurrir que las plantas transgénicas acumulen mayor cantidad de ceras cuticulares y/o de tricomas, los que también funcionan como barreras de protección frente a la radiación UV-B en las hojas (Ruban, 2014; Shepherd y Griffiths, 2006; Barnes y col., 2015). Sin embargo, deberían realizarse otros experimentos para validar esta hipótesis.



**Figura 3.25.** Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en hojas de plántulas de 12 días de la línea salvaje Col-0 y de la línea transgénica *MIM396*. a) El contenido de flavonoides se expresa como absorbancia a 330 nm por gramo de tejido fresco. b) El contenido de antocianinas se expresa como absorbancia a 540 nm por gramo de tejido fresco, longitud de onda a la que absorben estos pigmentos. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en seis grupos de muestras de cada genotipo. c) Promedio de la relación UV-B/C para el contenido de antocianinas en plantas Col-0 y *MIM396*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

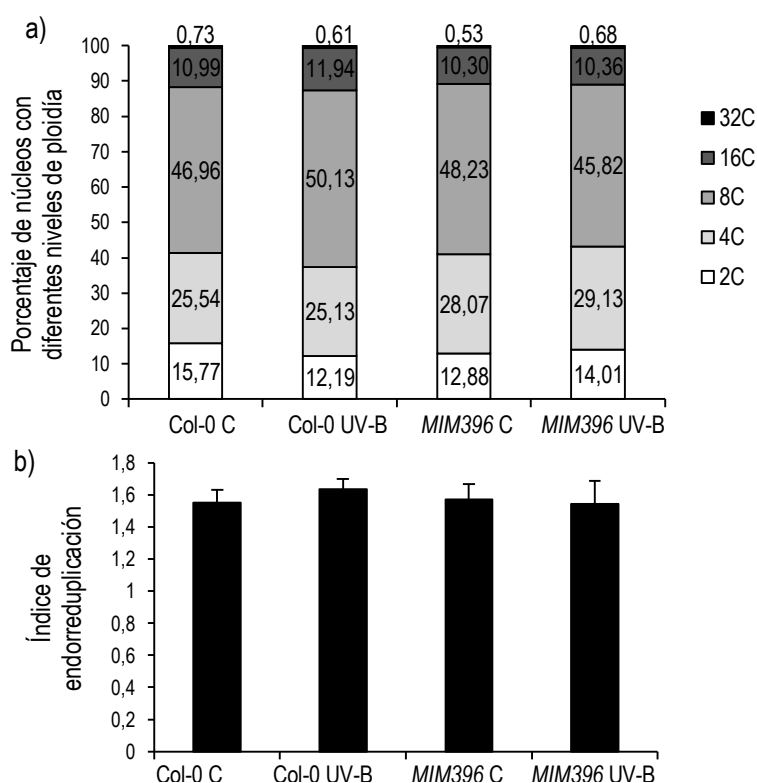


**Figura 3.26.** Ejemplos representativos de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396* de 12 días expuestas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control, y luego teñidas con NBT. La coloración azul oscura indica la presencia del anión superóxido. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.2.2.2.3. Los niveles de ploidía en la hoja #5 de las plantas *MIM396* no se modifican por la exposición al UV-B.

A partir del análisis a nivel microscópico de las hojas #5 completamente expandidas de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento, Casadevall y colaboradores (2013) concluyeron que las plantas *MIM396* presentan una menor inhibición del crecimiento de las hojas debido a una menor inhibición de la proliferación celular. Si bien a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis podemos sugerir que dicho fenotipo se relacionaría con una menor acumulación del daño en el ADN, nos propusimos además determinar los niveles de ploidía en las células de las hojas #5 de plantas salvajes Col-0 y *MIM396*.

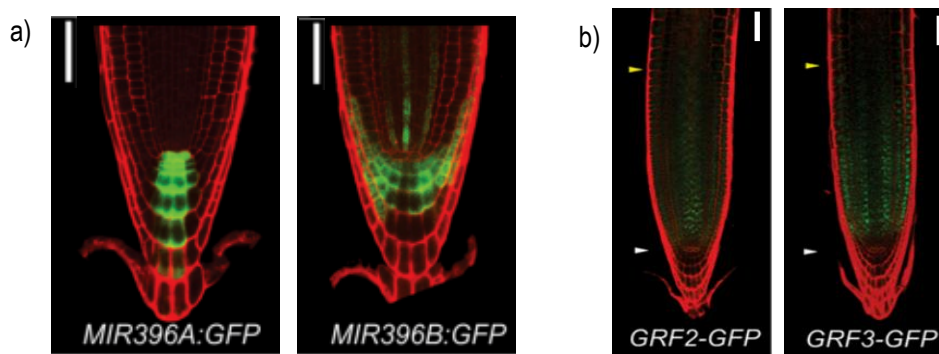
En la Figura 3.27 se muestra el porcentaje de núcleos que contienen ADN de diferentes niveles de ploidía y el índice de endorreduplicación, para las dos líneas en estudio en las dos condiciones ensayadas. Las hojas de la línea transgénica y de la línea salvaje no muestran cambios en el porcentaje de núcleos con diferentes niveles de ploidía entre la condición control y la de irradiación con UV-B.



**Figura 3.27.** a) Porcentaje de núcleos que contienen ADN con distintos niveles de ploidía en las hojas #5 completamente expandidas de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Índice de endorreduplicación de las hojas #5 de plantas salvajes y transgénicas. Las barras representan el promedio de triplicados biológicos y las barras de error corresponden al error estándar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.2.4. Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas *MIM396*.

En las raíces de *Arabidopsis*, la vía regulatoria conformada por el miR396 y los GRFs regula la transición de las células madre hacia las células en amplificación en el meristema radicular (Rodríguez y col., 2015; Ercoli y col., 2018). Los *GRFs* se expresan en las células en amplificación, mientras que el *miR396* lo hace en el nicho de células madre, que está constituido por las células del centro quiescente y las células madre adyacentes. Los *GRFs* son esenciales para la función de las células en amplificación, ya que, si disminuye su expresión, también disminuye la velocidad del ciclo celular, generándose divisiones celulares periclinales, típicas de las células madre. Contrariamente, la actividad del miR396 es necesaria para excluir a los *GRFs* del nicho de células madre. Estos patrones de expresión están representados en la Figura 3.28 (Rodríguez y col., 2015; Ercoli y col., 2018).

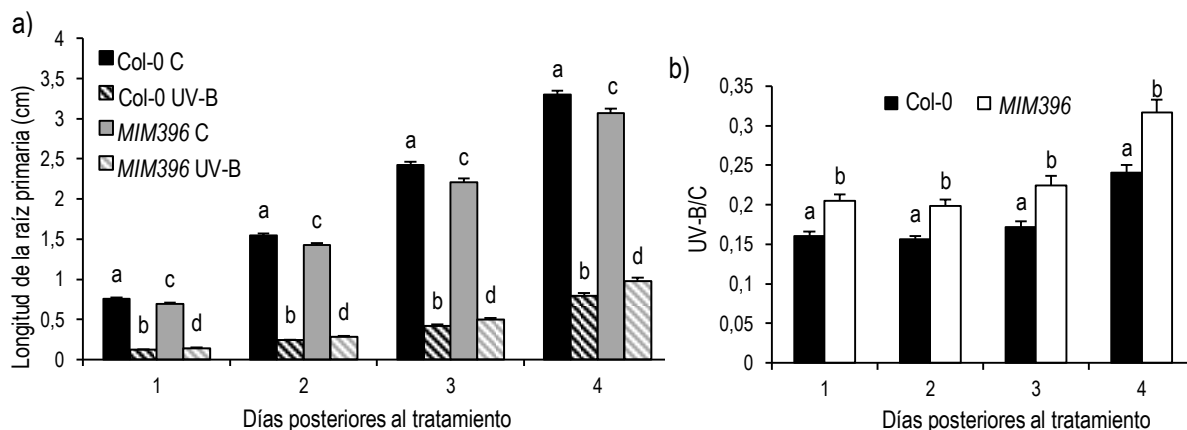


**Figura 3.28.** Análisis del patrón de expresión de los genes *MIR396A*, *MIR396B*, *GRF2* y *GRF3* mediante fusiones al gen reportero *GFP*. a) Los análisis microscópicos de las diferentes líneas transgénicas muestran que el miRNA396a se expresa fuertemente en el centro quiescente y en la columela, mientras que el miR396b lo hace con menor intensidad, lo que es coincidente con su patrón de expresión, ya que se expresa principalmente en la parte aérea de las plantas. b) En el caso de los genes *GRF2* y *GRF3*, se observa que su expresión ocurre específicamente en las células en amplificación del meristema radicular. Las barras de escala representan 50  $\mu$ m. Adaptado de Rodríguez y colaboradores (2015).

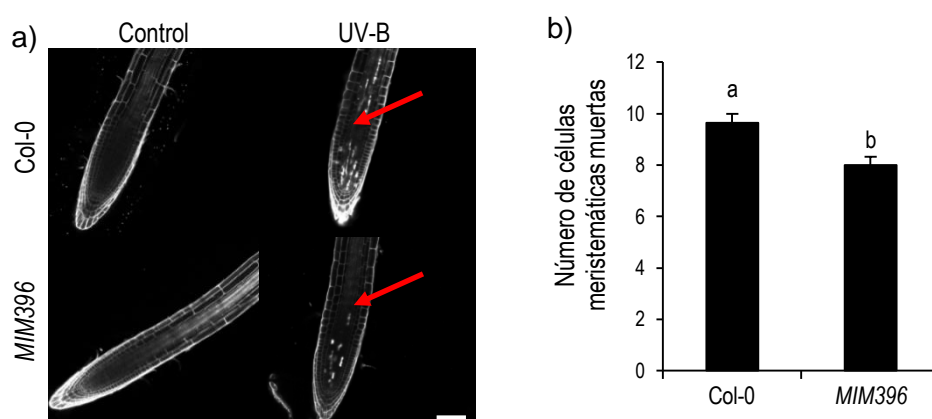
En base a lo reportado en la bibliografía, se analizó la inhibición de la elongación de la raíz primaria de plántulas *MIM396* por UV-B. En condiciones control en ausencia de UV-B, las raíces de las plantas *MIM396* son más cortas que las de las plantas salvajes Col-0, mientras que en las plántulas irradiadas con UV-B, la inhibición de la elongación es significativamente menor en las raíces *MIM396* que en las raíces de las plantas salvajes (Figura 3.29). Por lo tanto, los resultados indican que las raíces de las plántulas *MIM396* son fenotípicamente menos sensibles a la radiación UV-B que las de las plántulas salvajes Col-0.

Como fue descrito anteriormente, el crecimiento de las raíces depende, principalmente, de las células que se encuentran en proliferación activa en el meristema. Por ello, se analizó microscópicamente el meristema radicular de plántulas expuestas al UV-B. Cuando se cuantificó el número de células meristemáticas muertas, se determinó que este número es menor en las raíces de la

línea *MIM396* que en las de la línea salvaje Col-0 (Figura 3.30). Por lo tanto, la vía del miR396 y los GRFs podría estar involucrada en el control de procesos relacionados con la reparación del daño en el ADN y la muerte celular programada.



**Figura 3.29.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre la elongación de la raíz primaria en plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396* de 5 días. a) Longitud de la raíz primaria en función de los días posteriores al tratamiento control o con radiación UV-B. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en 30 raíces. b) Las barras representan el promedio de la relación entre la longitud de la raíz primaria de las plantas tratadas con UV-B, con respecto al de las plantas tratadas en condiciones control, en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.30.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre las células del meristema radicular de plántulas salvajes Col-0 y *MIM396*. a) Imágenes de raíces salvajes Col-0 y *MIM396* que fueron irradiadas con UV-B (2 W m<sup>-2</sup>) por 1 h o que permanecieron en condiciones control. Las flechas indican las células muertas en la zona meristemática. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. b) Las barras representan el número promedio de células meristemáticas muertas al analizar 40 raíces. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

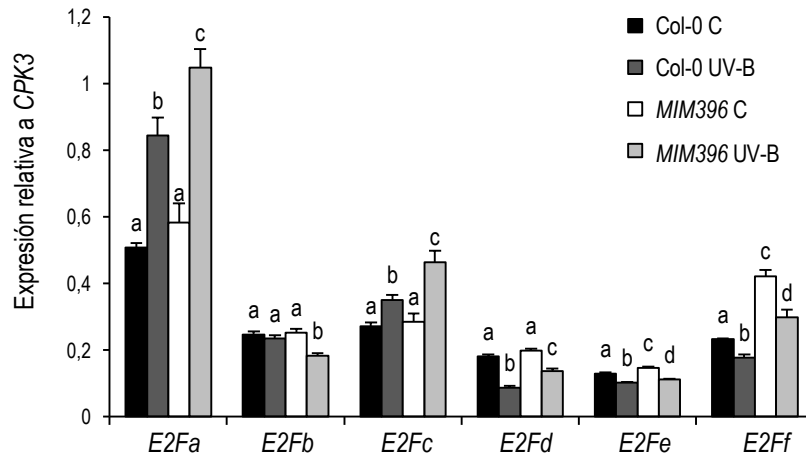


#### 3.2.2.2.5. Los factores de transcripción *E2F* se expresan diferencialmente en las plantas *MIM396* expuestas al UV-B.

Debido a que hay múltiples vías que controlan el desarrollo de las hojas en las plantas, y que se ha reportado que determinados factores de transcripción *E2F*, pertenecientes a la vía del Retinoblastoma, tienen roles en la regulación del crecimiento bajo condiciones de iluminación con UV-B (Radziejwoski y col., 2011), además de los descritos en este trabajo de Tesis, nos propusimos analizar los niveles de expresión de los factores de transcripción *E2F* en las plantas *MIM396*.

Para ello, se utilizó como material de partida sólo hojas #5. Esto se debe a que tanto los factores de transcripción *E2F* como los GRFs se expresan principalmente en células en división activa. La Figura 3.31 muestra los niveles de expresión relativos promedio obtenidos para cada *E2F* en cada línea en estudio, para hojas que fueron irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control. En ausencia de UV-B no se observaron diferencias en la expresión de los genes que codifican para los *E2F* entre las plantas salvajes Col-0 y las *MIM396*, a excepción de *E2Fe* y *E2Ff*, cuyos transcritos están aumentados en la línea transgénica. Luego de la irradiación con UV-B, *E2Fa* y *E2Fc* aumentan su expresión en ambas líneas, siendo mayor el incremento en la línea *MIM396*. A su vez, *E2Fd*, *E2Fe* y *E2Ff* presentan una disminución significativa en su expresión luego del tratamiento, siendo mayor el cambio en la línea salvaje. En el caso de *E2Fb*, su expresión no varía en las hojas #5 de plantas salvajes Col-0 luego de realizado el tratamiento con UV-B, mientras que *MIM396* muestra un descenso en sus niveles.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la radiación UV-B induce cambios en la expresión de los factores de transcripción pertenecientes a la vía del Retinoblastoma, y que existen diferencias en los niveles de expresión de los *E2F* entre la línea salvaje Col-0 y las plantas *MIM396*, principalmente luego del tratamiento con UV-B. Debido a que se ha reportado que hay una relación directa entre el miR396 y la regulación del crecimiento durante la respuesta al UV-B, y que este microARN participa en la regulación de la proliferación celular, los cambios observados sugieren que podría existir una interrelación entre las dos vías en estudio.



**Figura 3.31.** Análisis de la expresión de los genes que codifican para los seis factores de transcripción *E2F* de *Arabidopsis*. Se analizaron por RT-qPCR los niveles de expresión de cada uno de los *E2F*, en las hojas #5 de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *MIM396*, sometidas a tratamientos con radiación UV-B o en condiciones control. Las barras representan la expresión promedio relativizada a la del gen normalizador *CPK3*, y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniendo resultados similares.

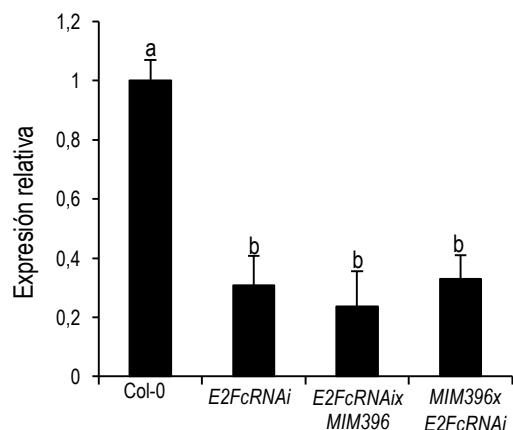
### 3.2.2.3. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas transgénicas *MIM396xE2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396*.

Al evaluar los resultados obtenidos para las líneas transgénicas *MIM396* y *E2FcRNAi*, las evidencias indican que existen respuestas en común frente a la radiación UV-B, como son la menor inhibición del crecimiento de las hojas, y por lo tanto de la roseta, lo que ocurre como consecuencia de una menor inhibición de la proliferación celular, con respecto a lo determinado en la línea salvaje Col-0. Además, las hojas en crecimiento de la línea *E2FcRNAi* que fueron expuestas a la radiación UV-B, presentaron una menor inducción en la expresión del *miR396* que las plantas salvajes. Por lo tanto, *E2Fc* podría estar afectando la actividad del *miR396* o viceversa.

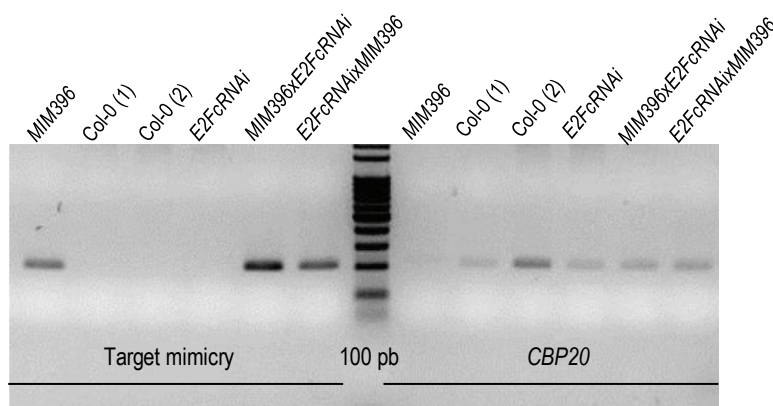
Por ello, y debido a que uno de los objetivos particulares de este capítulo es determinar si existe una conexión entre la vía del Retinoblastoma y la del *miR396* y los GRFs, se realizaron cruza manuales recíprocas entre plantas de las líneas *MIM396* y *E2FcRNAi*, obteniéndose las líneas doble transgénicas *MIM396xE2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396*.

#### 3.2.2.3.1. Análisis de la presencia de los transgenes en las plantas obtenidas mediante cruza genéticas.

Una vez obtenidas las semillas, se procedió a verificar que las plantas presenten disminuida la expresión del gen *E2Fc* y que contengan el target mimicry, proveniente a la línea parental *MIM396*. Para ello, se realizaron ensayos de RT-qPCR en los que se cuantificó el transcripto *E2Fc*, verificándose que las dos líneas resultantes de las cruza presentan niveles disminuidos del transcripto y similares a los de su línea parental *E2FcRNAi* (Figura 3.32). Además, mediante reacciones de PCR utilizando cebadores específicos que hibridan sobre el extremo 3' del target mimicry, se confirmó que las nuevas líneas obtenidas también contienen dicha construcción (Figura 3.33).



**Figura 3.32.** Cuantificación de los niveles del transcripto *E2Fc* en hojas de las líneas salvaje Col-0, *E2FcRNAi*, *MIM396*x*E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396*, determinados por ensayos de RT-qPCR y utilizando como gen normalizador *CBP20* (Cap-binding Protein). Las barras representan la expresión promedio de *E2Fc* relativa a la determinada en Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al realizar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por duplicado, obteniéndose resultados similares.



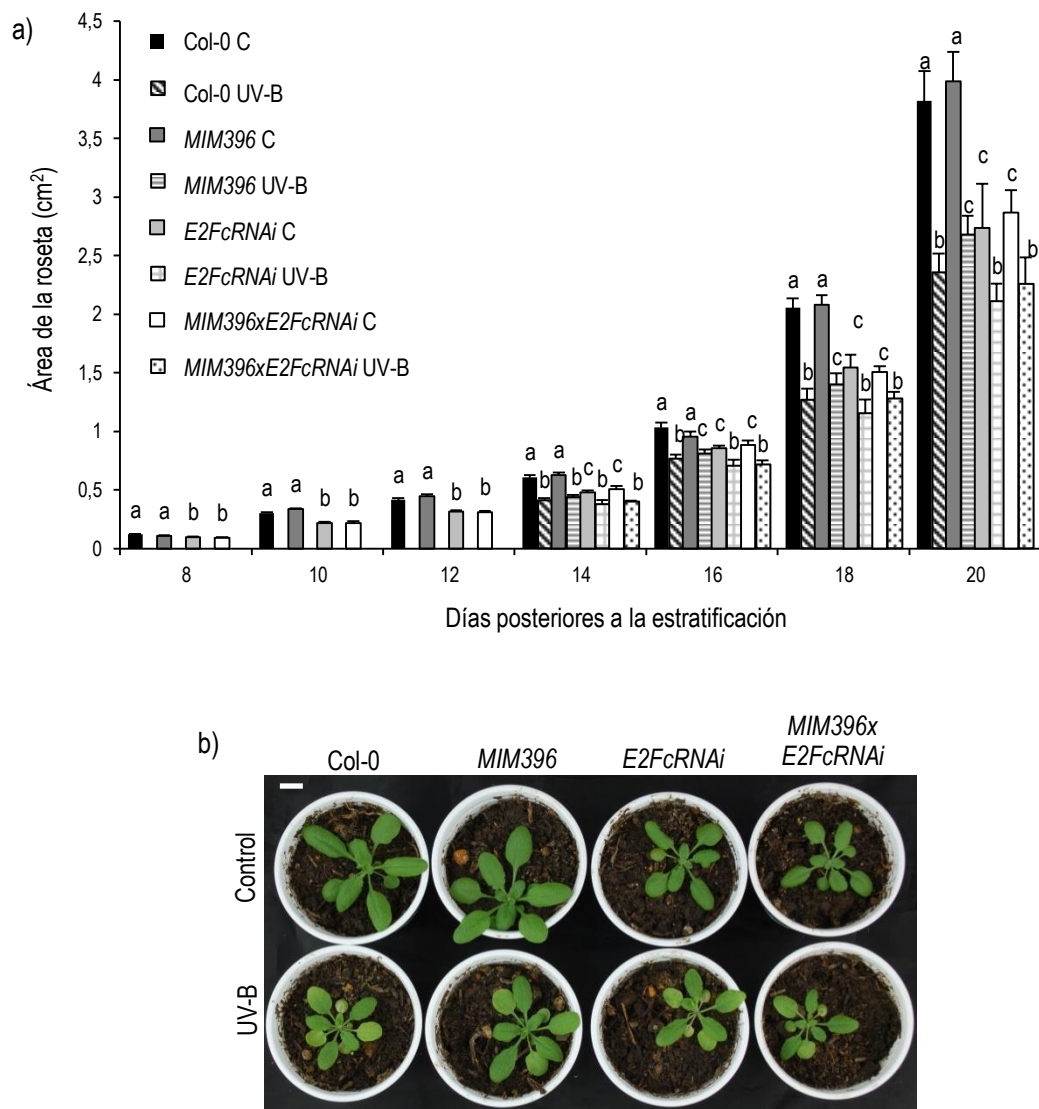
**Figura 3.33.** Imagen de un gel de agarosa 2% (P/V) en el que se sembraron los productos obtenidos por PCR. Como molde se utilizó ADNc de las líneas *MIM396*, salvaje Col-0, *E2FcRNAi*, *MIM396*x*E2FcRNAi*, y *E2FcRNAi*x*MIM396*, obtenidos a partir de muestras de hojas. Los oligonucleótidos cebadores utilizados hibridan sobre el extremo 3' del target mimicry. Para realizar el control positivo de las reacciones de PCR se usaron oligonucleótidos cebadores para el transcripto de *CBP20*. Con ambos pares de cebadores, el producto de amplificación obtenido fue de 220 pb. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb.

A continuación, se llevaron a cabo diferentes experimentos con el fin de caracterizar las respuestas de las plantas *MIM396*x*E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396* a la radiación UV-B. Debido a que se obtuvieron resultados similares entre las dos líneas resultantes de las cruces, en los siguientes apartados sólo se describen los resultados de la línea *MIM396*x*E2FcRNAi*, mientras que los de la línea *E2FcRNAi*x*MIM396* se muestran en el Anexo (Capítulo 6).

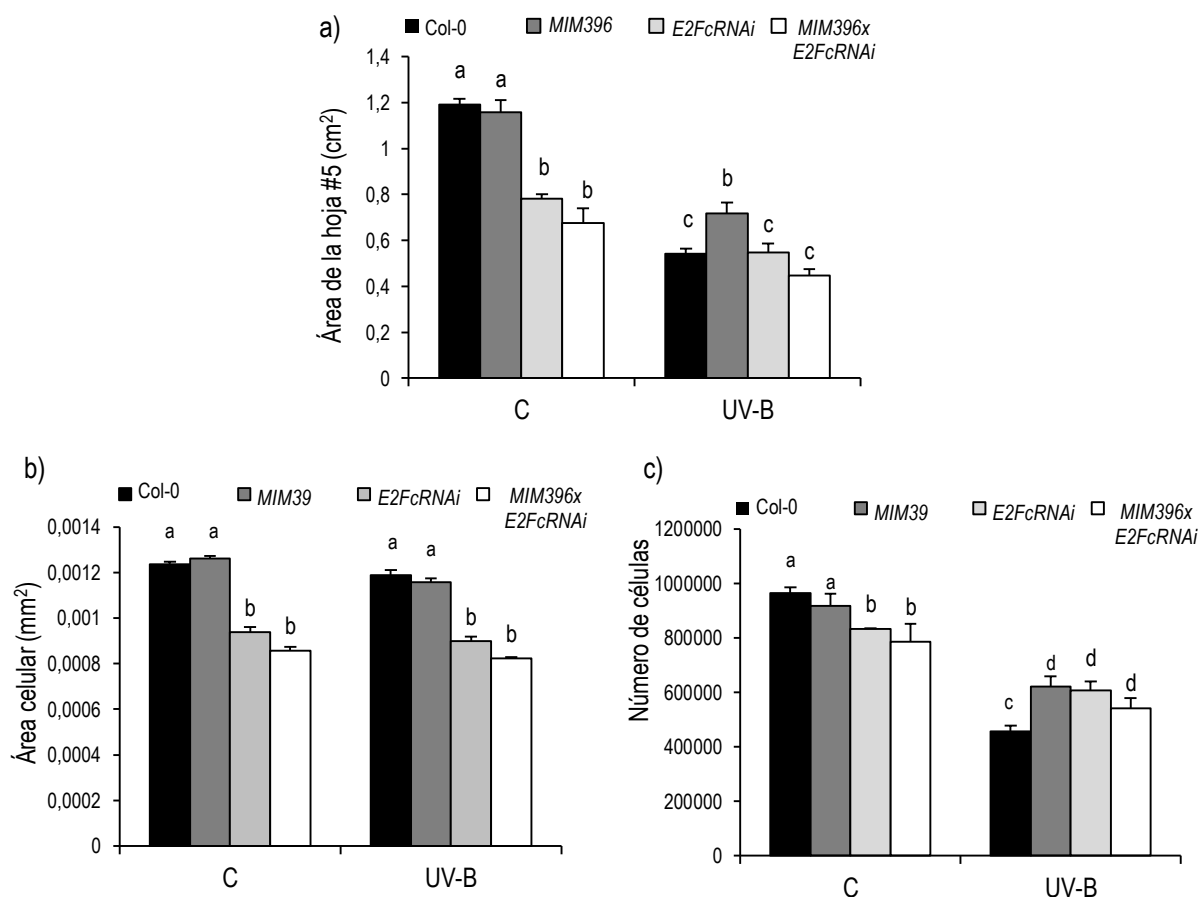
#### 3.2.2.3.2. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las hojas de las plantas *MIM396xE2FcRNAi* de manera similar a como lo hace en las líneas parentales.

En primer lugar, se cuantificó el área de la roseta de las plantas *MIM396xE2FcRNAi*, que fueron expuestas al UV-B o que permanecieron en condiciones control sin UV-B, para su comparación con la de las líneas parentales. Como fue descrito anteriormente, las plantas *E2FcRNAi* poseen menor área de roseta en condiciones control que las plantas salvajes Col-0, lo que también fue observado en las plantas *MIM396xE2FcRNAi*. Por el contrario, las plantas *MIM396* no presentan diferencias en el área de la roseta con las plantas salvajes en condiciones control (Casadevall y col., 2013). Luego de realizado el tratamiento con UV-B, las plantas *MIM396xE2FcRNAi* muestran una menor inhibición del crecimiento que las plantas salvajes Col-0, lo cual es similar a lo observado en las plantas de las líneas parentales *E2FcRNAi* y *MIM396* (Figura 3.34; Casadevall y col., 2013).

Con el objetivo de dilucidar si la menor inhibición del crecimiento de las hojas luego del tratamiento con UV-B se debía cambios en el área celular y/o en la proliferación celular, se analizaron a nivel microscópico las hojas #5 totalmente expandidas. En condiciones control, el área promedio de las hojas #5 de las plantas *MIM396xE2FcRNAi* es similar al de las hojas #5 de las plantas *E2FcRNAi*, y por lo tanto, de menor tamaño que las de las plantas *MIM396* y salvajes Col-0 (Figura 3.35). Al analizar a nivel microscópico el área y el número de células del parénquima en empalizada de estas hojas, se determinó que estos parámetros también son similares a los de las plantas *E2FcRNAi*, es decir, que las hojas #5 de la línea *MIM396xE2FcRNAi*, en condiciones control de crecimiento, poseen menor cantidad de células y de menor tamaño que las hojas *MIM396* y salvajes Col-0. Por otro lado, aquellas hojas que fueron irradiadas con UV-B lucen un fenotipo de menor inhibición del crecimiento que las hojas salvajes, debido a que presentan menor inhibición de la proliferación celular. Si bien esta es una respuesta común entre las líneas parentales, el fenotipo de las plantas *MIM396xE2FcRNAi* también es similar al de la línea *E2FcRNAi* luego de la exposición al UV-B. Por lo tanto, el factor de transcripción *E2Fc* cumpliría un rol de manera epistática sobre el microARN 396.



**Figura 3.34.** a) Análisis del área de la roseta de plantas salvajes Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *MIM396xE2FcRNAi* en condiciones control y luego de irradiar las plantas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h. Los tratamientos fueron realizados a los 12 días de crecimiento, que es el momento del desarrollo en el que está comenzando a formarse la hoja #5. Las barras representan el promedio de 10 plantas y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) Imagen representativa de las plantas de los distintos genotipos, 2 semanas luego de realizado el tratamiento con radiación UV-B o el tratamiento en condiciones control. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

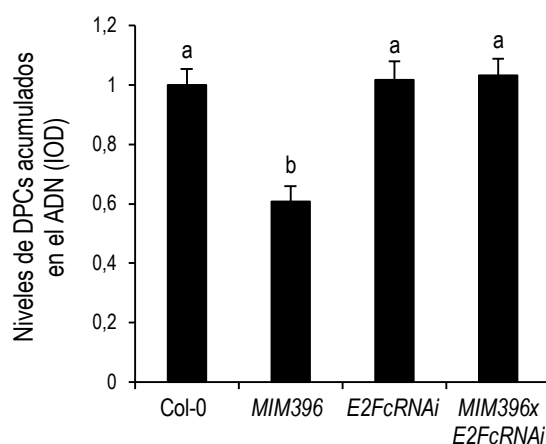


**Figura 3.35.** Análisis de las hojas #5 de plantas salvajes Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *MIM396xE2FcRNAi* irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condiciones control. En las mismas se cuantificó: a) el área de las hojas #5 completamente expandidas, b) el área de las células y c) el número de células del parénquima en empalizada. Las barras representan el promedio de 10 hojas y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.2.2.3.3. Las plantas *MIM396xE2FcRNAi* acumulan daño en el ADN en niveles similares a los de las plantas *E2FcRNAi*.

A continuación, se cuantificaron los niveles de DPCs acumulados en el ADN en las hojas de las plantas de los distintos genotipos, que a los 12 días posteriores a la estratificación fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o permanecieron en condiciones control. En la Figura 3.36 se muestran los valores promedio de DPCs acumulados en el ADN de las líneas salvaje Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *MIM396xE2FcRNAi* luego de ser irradiadas con UV-B, ya que en las plantas que permanecieron en condiciones control no se detectó daño cuantificable. Sólo las plantas *MIM396* acumulan menor cantidad de daño en el ADN, mientras que las demás líneas presentan niveles de DPCs más altos y similares entre ellas. Este resultado también demuestra que las plantas resultantes de las cruces tienen

una respuesta similar a la de su parental *E2FcRNAi*, por lo que la disminución en la expresión de *E2Fc* tendría un efecto dominante sobre la regulación llevada a cabo por el miR396 en respuesta al UV-B.



**Figura 3.36.** Cuantificación por densitometría (IOD, Integrated Optical Density) de los niveles de DPCs acumulados en el ADN en hojas de plantas de 12 días de las líneas salvaje Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *MIM396xE2FcRNAi* que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h. Las barras representan el promedio de 6 grupos de plántulas para cada una de las líneas analizadas, relativizados al promedio obtenido en las plantas salvajes Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

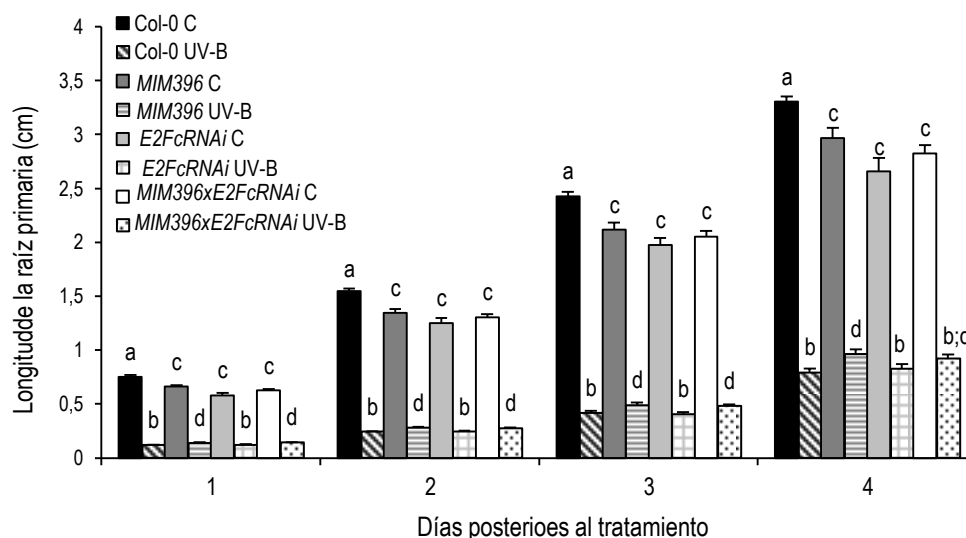
#### 3.2.2.3.4. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria de las plantas *MIM396xE2FcRNAi*.

Debido a que previamente se estudió el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz principal en las líneas parentales, nos propusimos realizar también dicha caracterización fenotípica en las plantas obtenidas a partir de las cruza, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.10.1 de Materiales y Métodos. La raíz primaria de las plántulas *MIM396xE2FcRNAi* en condiciones control de crecimiento, muestra una longitud similar a la de sus parentales, es decir, es más corta que la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0 (Figura 3.37). Luego del tratamiento con UV-B, las mismas muestran una menor inhibición del crecimiento que las de las plantas salvajes, siendo su longitud similar a la de las plantas *MIM396*, a excepción del cuarto día posterior al tratamiento, en el que presentan una longitud intermedia en relación a la de sus parentales. Si bien las diferencias son estadísticamente significativas, las mismas son muy pequeñas, por lo que se podría inferir que las líneas resultantes de la cruza presentan una respuesta global a la radiación UV-B que es similar a las de sus dos parentales, no mostrando un fenotipo similar al de la parental *E2FcRNAi* como ocurre en la parte aérea de estas plantas (Figura 3.37).

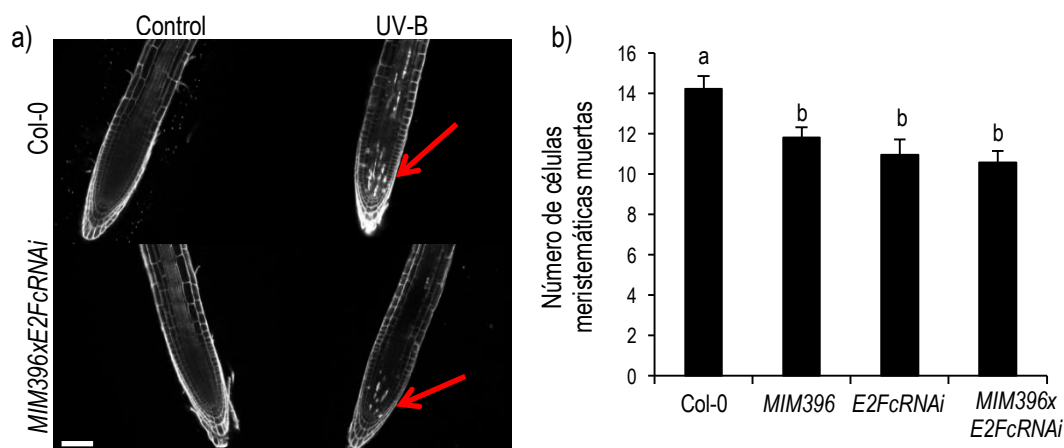
Posteriormente, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el meristema radicular, para lo cual se llevó a cabo la cuantificación del número de células meristemáticas muertas. En condiciones control



no se observan células meristemáticas muertas en las raíces de la línea *MIM396xE2FcRNAi*, al igual que en las demás líneas analizadas previamente. Sin embargo, al igual que las líneas *MIM396* y *E2FcRNAi*, la línea *MIM396xE2FcRNAi* contiene menor número de células meristemáticas muertas que las raíces de las plantas salvajes (Figura 3.38). Por lo tanto, este análisis demuestra que las raíces de todas las líneas transgénicas bajo estudio responden de manera similar a la radiación UV-B.



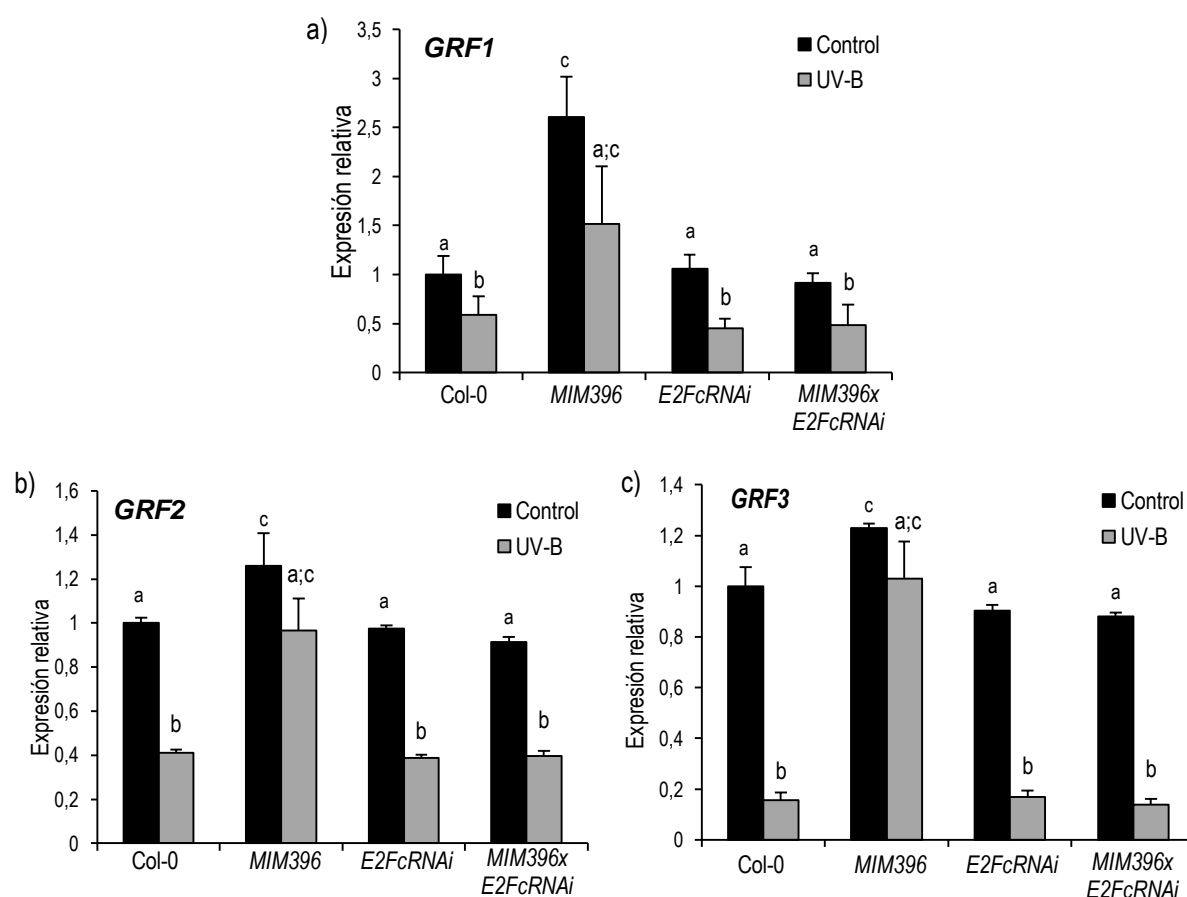
**Figura 3.37.** Análisis de la elongación de la raíz primaria en función de los días posteriores a los tratamientos. Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas salvajes y de plantas doble transgénicas *MIM396xE2FcRNAi*, junto al de sus parentales *MIM396* y *E2FcRNAi*, en condiciones control o de exposición al UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h. Las barras representan el promedio de 30 raíces y las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ) para cada día analizado. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.38.** Cuantificación del número de células muertas en el meristema radicular, luego de exponer plántulas de 5 días a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h. a) Imágenes tomadas en el microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) luego de teñir las raíces con Ioduro de Propidio. Las flechas indican las células muertas en la zona meristemática. b) El gráfico representa el número de células meristemáticas muertas luego de 24 h de haber finalizado el tratamiento con UV-B. Las barras representan el promedio de 40 raíces y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). La barra de escala representa  $100 \mu\text{m}$ . El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.2.2.3.5. Los niveles de expresión de los factores de transcripción *GRFs* son similares entre las plantas *MIM396xE2FcRNAi* y *E2FcRNAi*.

Debido a que las plantas *MIM396xE2FcRNAi* presentan expresión disminuida de *E2Fc* y del miR396 simultáneamente, se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción *GRF1*, *GRF2* y *GRF3*, ya que, en las líneas parentales, estos presentan diferentes niveles de expresión tanto en condiciones control como luego de la exposición al UV-B. Para ello, se realizaron ensayos de RT-qPCR utilizando como molde ADNc obtenido a partir de hojas #5 en desarrollo, provenientes de plantas de 12 días que fueron irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control. Los resultados muestran que, en ambas condiciones en estudio, los niveles de los transcritos de *GRF1*, *GRF2* y *GRF3* son similares entre las plantas *MIM396xE2FcRNAi*, su parental *E2FcRNAi*, y la línea salvaje Col-0 (Figura 3.39). Por lo tanto, la regulación pos-transcripcional de los factores de transcripción *GRFs* llevada a cabo por el miR396 es contrarrestada por los bajos niveles del factor de transcripción *E2Fc*.



**Figura 3.39.** Análisis de la expresión de los genes a) *GRF1*, b) *GRF2* y c) *GRF3* por RT-qPCR. En los gráficos se representan con barras los niveles promedio de la expresión relativizados al promedio de la muestra salvaje Col-0 tratada en condiciones control, para las líneas transgénicas y la línea salvaje, en las dos condiciones en estudio. Las barras de error representan el error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.2.2.4. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas cuádruple mutantes en los factores de transcripción TCP2, TCP3, TCP4 y TCP10 (*tcp2x3x4x10*).

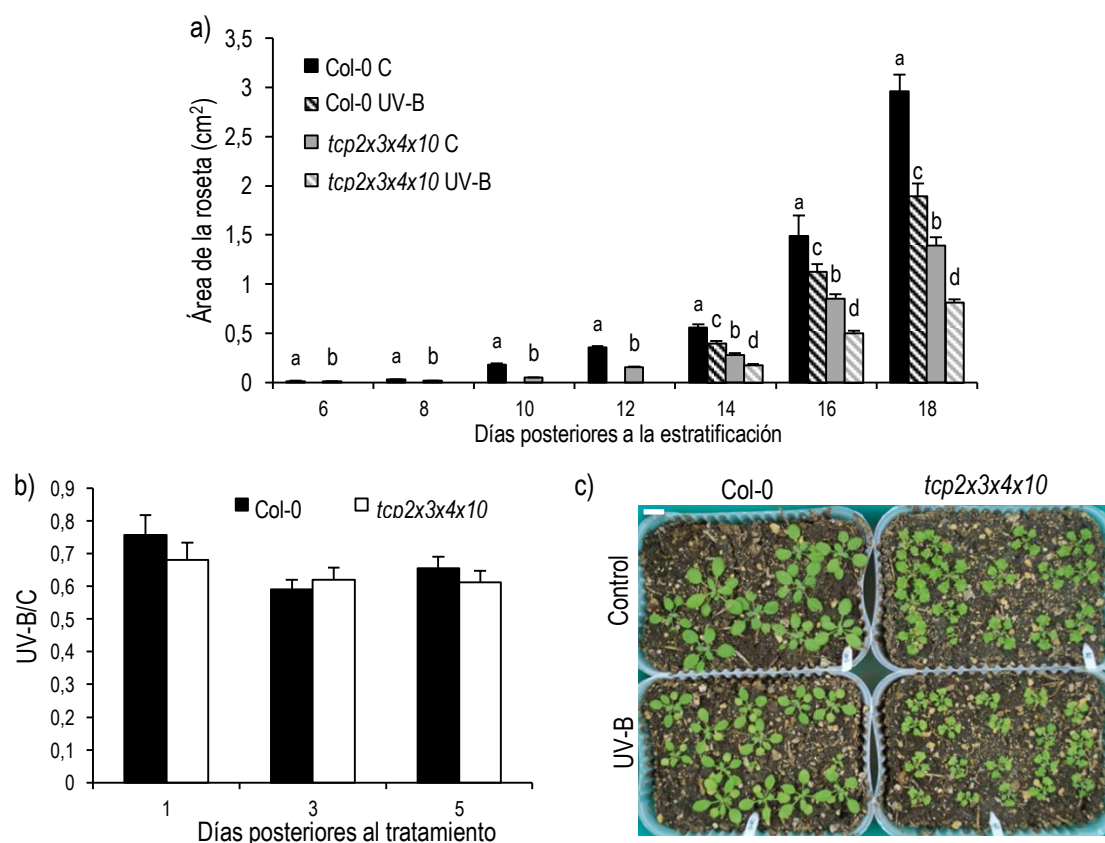
Los TCPs son una clase de factores de transcripción que controlan diferentes aspectos del crecimiento de las plantas, y especialmente, el desarrollo de las hojas (Martin-Trillo y Cubas, 2010). Dentro de los TCP de Clase II se encuentran los TCP2, TCP3, TCP4, TCP10 y TCP24, los cuales son regulados pos-transcripcionalmente por el microARN miR319, y presentan funciones redundantes (Palatnik y col., 2003; Bresso y col., 2018). En particular, estos TCPs regulan la expresión del miR396 y cumplen funciones importantes en la represión de la proliferación celular, lo que depende, en parte, de la activación del miR396 (Schommer y col., 2014).

Por lo tanto, para investigar si las respuestas frente al UV-B mediadas por el miR396 son reguladas por la actividad de los factores de transcripción TCP de Clase II, realizamos una caracterización fenotípica de estas respuestas en plantas cuádruple mutantes *tcp2x3x4x10*.

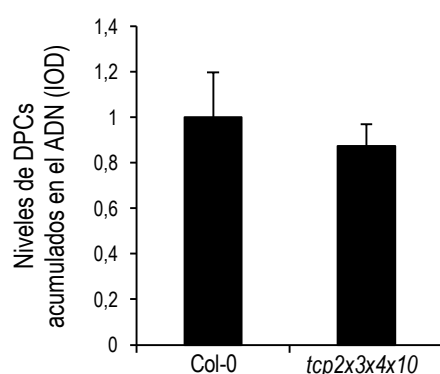
##### 3.2.2.4.1. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la roseta y cuantificación del daño acumulado en el ADN.

En primer lugar, se analizó el crecimiento de la roseta de las plantas mutantes *tcp2x3x4x10* que fueron expuestas al UV-B. En condiciones control, las plantas *tcp2x3x4x10* presentan un área de roseta menor que las plantas salvajes, y sus hojas poseen bordes arrugados (Figura 3.40a y c), como fue descrito por Bresso y colaboradores (2018). Por otro lado, las plantas expuestas al UV-B muestran una marcada disminución en el área de la roseta, siendo esta disminución similar entre las plantas de la línea salvaje Col-0 y las plantas mutantes (Figura 3.40b).

A continuación, se analizó la acumulación del daño en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B. Las hojas de las plantas salvajes y de las plantas *tcp2x3x4x10* acumulan niveles similares de DPCs en su ADN (Figura 3.41); mientras que en condiciones control no se detectó daño en el ADN cuantificable para ninguna de las dos líneas en estudio.



**Figura 3.40.** Análisis del crecimiento de la roseta de plantas salvajes Col-0 y mutantes *tcp2x3x4x10*, que a los 12 días de crecimiento fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condiciones control. a) Área promedio de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación. Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas. b) Relación entre el promedio del área de la roseta de plantas irradiadas con UV-B y las que permanecieron en condiciones control, en función de los días posteriores a la realización de los tratamientos. c) Fotografía en donde se muestran las plantas de los dos genotipos en las dos condiciones ensayadas, una semana después de haber finalizado los tratamientos. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por duplicado, obteniéndose resultados similares.

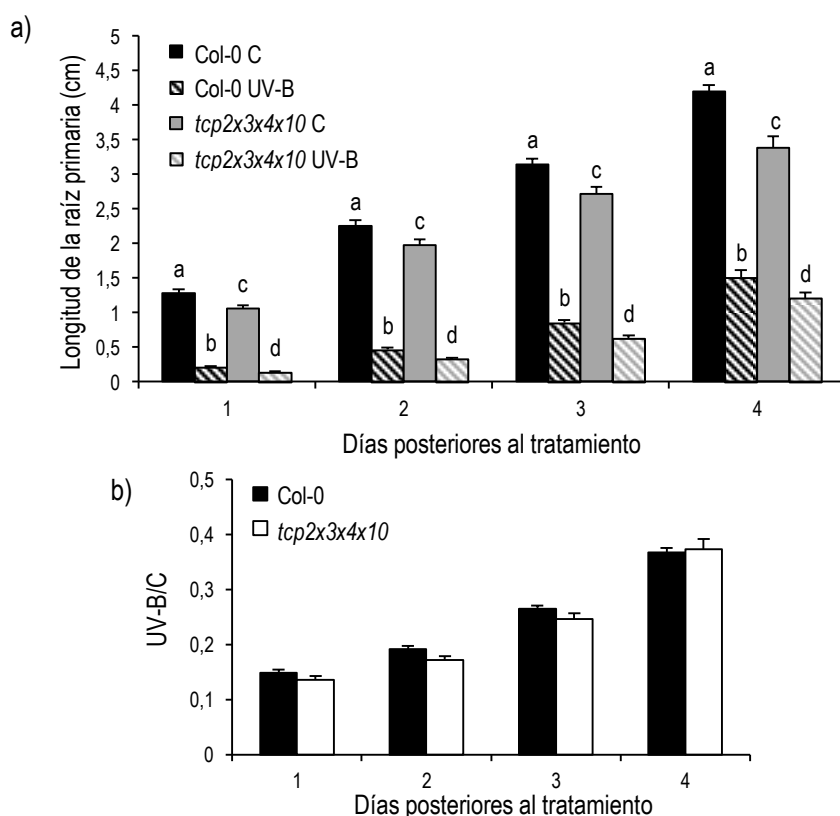


**Figura 3.41.** Cuantificación del daño acumulado en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B durante 4h, determinado por ensayos de dot blot utilizando anticuerpos anti-DPCs. El análisis se realizó por densitometría (IOD, Integrated Optical Density) de la membrana obtenida. Las barras representan el promedio de 6 grupos de plantas, relativizado al promedio obtenido para las muestras de la línea salvaje, y las barras de error corresponden al error estándar. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por duplicado, obteniéndose resultados similares.

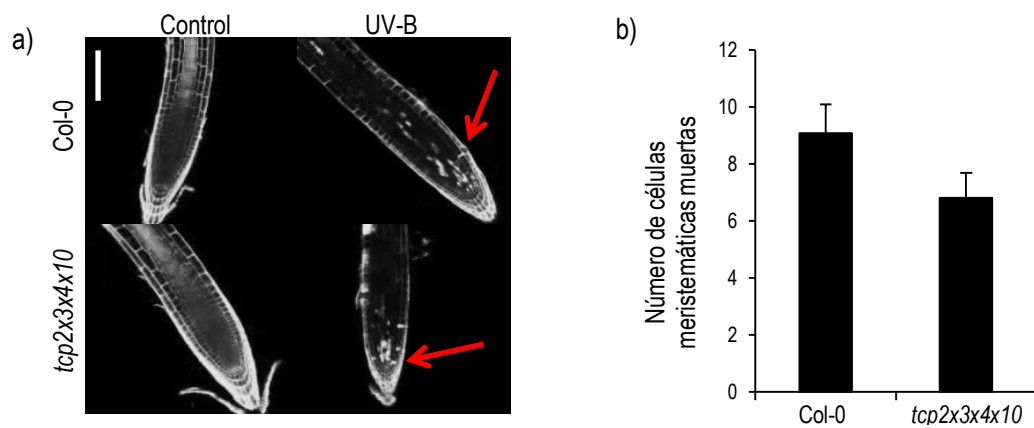
### 3.2.2.4.2. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria.

Cuando se analizó el crecimiento de las raíces primarias de las plántulas *tcp2x3x4x10* en condiciones control en ausencia de UV-B, se observó que las mismas son más cortas que las raíces de las plántulas salvajes (Figura 3.42a). Luego del tratamiento con UV-B, si bien las raíces *tcp2x3x4x10* también son más cortas que las raíces de las plántulas salvajes Col-0, en ambas líneas la inhibición de la elongación por la radiación UV-B es similar (Figura 3.42b).

Por último, se evaluó microscópicamente el meristema radicular, con el fin de cuantificar el número de células meristemáticas muertas luego de la exposición a la radiación UV-B. En condiciones control de crecimiento, las raíces de las plantas salvajes y las mutantes no poseen células muertas en su meristema; mientras que aquellas que fueron expuestas a la radiación UV-B muestran células muertas, siendo similar la cantidad entre las dos líneas en estudio. (Figura 3.43). Por lo tanto, podemos concluir que las respuestas de las plantas *MIM396* a la radiación UV-B son independientes de la actividad regulatoria de los factores de transcripción TCP de Clase II.



**Figura 3.42.** Análisis de la elongación de la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0 y *tcp2x3x4x10*, luego de ser expuestas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. a) Las barras representan el promedio de la longitud de la raíz primaria obtenido a partir del análisis de 30 plantas de cada genotipo, en función de los días posteriores a los tratamientos. b) Las barras representan la relación entre los promedios de las raíces que recibieron radiación UV-B con respecto a las que permanecieron en condiciones control, en función de los días posteriores a los tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 3.43.** a) Fotografías tomadas con un microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) de raíces tratadas con UV-B durante 1 h o que permanecieron en condiciones control, luego de ser teñidas con Ioduro de Propidio. Las regiones totalmente coloreadas, indicadas con flechas, corresponden a las células meristemáticas muertas. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. b) Gráfico que representa el número promedio de células meristemáticas muertas por raíz, para la línea salvaje Col-0 y la línea mutante *tcp2x3x4x10*. Las barras representan el promedio obtenido a partir del análisis de 40 raíces, y las barras de error corresponden al error estándar. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.3. Rol del factor de transcripción E2Fb en las respuestas a la radiación UV-B.

#### 3.3.1. INTRODUCCIÓN

Los factores de transcripción de la familia E2F se encuentran conservados en los organismos eucariotas, cumpliendo funciones importantes y antagonistas en diversas vías relacionadas con el control de la división celular, la reparación del ADN dañado y la diferenciación. En plantas, estos procesos actúan conjuntamente en aquellas zonas que están en crecimiento, con el fin de producir un desarrollo post-embionario adecuado en respuesta a señales internas y del ambiente. De los seis factores de transcripción E2F presentes en *Arabidopsis*, tres forman heterodímeros con las proteínas DP para unirse al ADN, y a su vez, dos de ellos han sido identificados como activadores transcripcionales de sus genes blanco, E2Fa y E2Fb (Sozzani y col., 2006). En esta sección, enfocaremos nuestro estudio en la proteína E2Fb.

Durante el transcurso del ciclo celular, el transcripto *E2Fb* se acumula principalmente durante la transición entre las fases G1 y S, mientras que en las siguientes fases sus niveles se mantienen bajos y constantes (Mariconti y col., 2002). En cuanto a su rol como activador transcripcional, se ha demostrado que E2Fb regula positivamente la expresión de genes marcadores de las fases G1/S y G2/M y estimula la división celular, a la vez que acorta el tiempo de duplicación e inhibe el crecimiento celular y la diferenciación (Sozzani y col., 2006). Con respecto a la regulación de su expresión, su promotor presenta sitios putativos de unión para factores de transcripción E2Fs. E2Fa interaccionaría con estos elementos en *cis*, activando la expresión de *E2Fb*, ya que plantas transgénicas que sobre-expresan *E2Fa* presentan niveles elevados del transcripto *E2Fb* y también de la correspondiente proteína. Sin embargo, E2Fa y E2Fb pueden actuar de forma independiente dependiendo del contexto celular (Vandepoele y col., 2005; Sozzani y col., 2006).

En cuanto a la expresión de *E2Fb* durante el desarrollo de *A. thaliana*, se ha descrito que la misma depende del estadio de desarrollo de la planta. Mediante análisis histoquímicos, en los que se utilizaron plantas que expresan el gen reportero *GUS* fusionado al promotor de *E2Fb* y por ensayos de hibridación *in situ*, Sozzani y colaboradores (2006) demostraron que, en plántulas de 4 días, *E2Fb* se expresa en el meristema apical y en el tejido vascular de los cotiledones. En plantas de 7 y 18 días, *E2Fb* se expresa en hojas jóvenes y en la base de los tricomas. En la raíz, se observó expresión en el meristema radicular, particularmente en la zona de elongación celular y en los primordios de raíces laterales; mientras que en las flores, *E2Fb* se expresa en las anteras y en los granos de polen.

Por otro lado, la estabilidad proteica de E2Fb aumenta en presencia de auxinas, por lo que se propone que E2Fb sería importante en la transducción de señales desencadenada por esta hormona, la cual interviene en la decisión de las células de continuar con la proliferación celular o de entrar en el programa de endoreduplicación (Magyar y col., 2005). También se ha reportado que los niveles de la

proteína E2Fb son regulados por la luz, debido a que cuando plántulas crecidas en oscuridad son transferidas a la luz se produce la síntesis y la estabilización de E2Fb. Esta regulación ocurre de manera simultánea y opuesta a la del factor de transcripción E2Fc, que en presencia de luz es degradado en el proteosoma (del Pozo y col., 2002; López-Juez y col., 2008). Este mecanismo de regulación es dependiente de COP1, ya que plantas mutantes en esta proteína con actividad E3 ubiquitin-ligasa presentan niveles aumentados de las proteínas E2Fb y E2Fc de manera constitutiva e independiente de la luz (López-Juez y col., 2008). Este mecanismo de regulación se encuentra relacionado con el efecto que produce la luz sobre el crecimiento y la progresión a través del ciclo celular en los meristemas (López-Juez y col., 2008). En relación a esto, Berckmans y colaboradores (2011) describieron que la expresión de *E2Fe* se encuentra modulada por la luz y es regulada de manera antagónica por E2Fb y E2Fc. En presencia de luz, E2Fb se une a un sitio consenso en el promotor de *E2Fe* y activa su expresión, manteniendo de esta manera la proliferación celular y evitando la endorreduplicación. Contrariamente, durante períodos de oscuridad, E2Fc se une al mismo elemento en *cis*, reprimiendo la expresión de *E2Fe* y promoviendo el inicio del endociclo.

Como se detalla en la Introducción, el factor de transcripción E2Fe modula la respuesta de las plantas frente a condiciones de irradiación con UV-B al regular la expresión del gen *UVR2*, que codifica para la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs, y la transición hacia el endociclo (Radziejewski y col., 2011). Por lo tanto, en base a lo descrito en la bibliografía y con el fin de profundizar sobre el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, investigamos el posible rol del factor de transcripción E2Fb en los distintos mecanismos de respuesta frente a esta radiación en plantas de *Arabidopsis*.



### 3.3.2. RESULTADOS

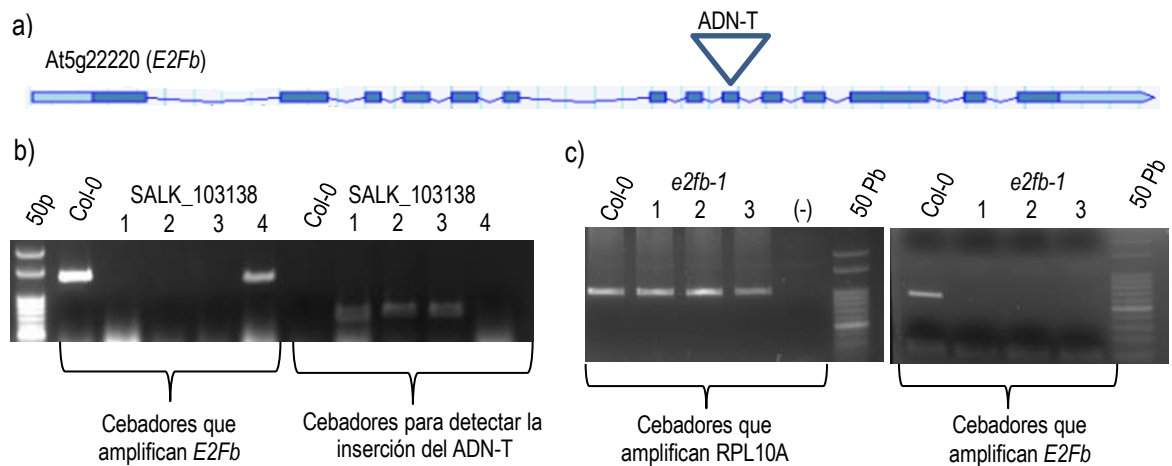
#### 3.3.2.1. Caracterización de las respuestas a la radiación UV-B en plantas que presentan niveles alterados en la expresión del transcripto que codifica para E2Fb.

##### 3.3.2.1.1. Identificación de plantas mutantes de *A. thaliana* por inserción de ADN-T en el gen *E2Fb* y de plantas transgénicas *E2FbOE*.

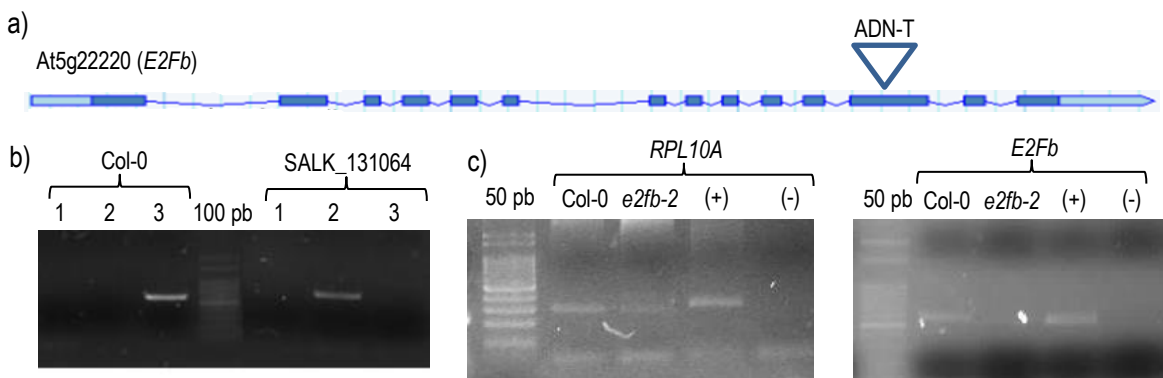
Para investigar el rol del factor de transcripción E2Fb durante el desarrollo y crecimiento de las plantas expuestas a la radiación UV-B, se identificaron dos líneas mutantes de *A. thaliana* por inserción de ADN-T en el gen *E2Fb*.

La selección de plantas mutantes homocigotas de las líneas SALK\_103138 (*e2fb-1*) y SALK\_131064 (*e2fb-2*) se realizó mediante ensayos de PCR utilizando cebadores específicos que hibridan sobre el gen *E2Fb*, específicamente diseñados en la zona donde se encuentra inserto el ADN-T en cada caso, y un cebador que hibrida sobre el borde izquierdo del ADN-T (Tabla 1 de la sección Materiales y Métodos). Como molde se utilizó ADN genómico extraído de hojas de plantas salvajes Col-0 y de plantas de cada una de las líneas mutantes. Luego, mediante ensayos de RT-PCR, utilizando como molde el ADNc de las plantas salvajes y de las plantas que resultaron homocigotas para la inserción del ADN-T, se confirmó la inactivación transcripcional del gen *E2Fb* (Figuras 3.44 y 3.45).

En condiciones control de crecimiento, no se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas salvajes y las plantas mutantes homocigotas seleccionadas. Debido a que las respuestas a la radiación UV-B analizadas son similares entre las dos líneas mutantes, a continuación se presentan los resultados obtenidos para la línea *e2fb-1*, mientras que los resultados de la de línea *e2fb-2* se muestran en el Anexo (Capítulo 6).

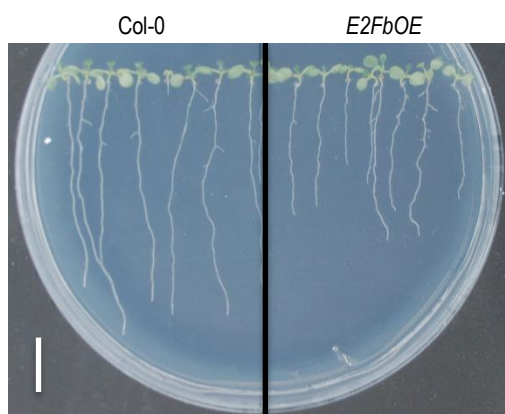


**Figura 3.44.** Identificación de plantas mutantes homocigotas de la línea SALK\_103138 (*e2fb-1*). a) Esquema del gen *E2Fb*. El ADN-T se encuentra inserto en el noveno exón y el sitio de inserción se representa con un triángulo. Los rectángulos azules representan a los exones y las líneas azules a los intrones. Las regiones 5' y 3' UTR se indican con rectángulos celestes. b) Identificación de plantas mutantes homocigotas *e2fb-1*. En el gel de agarosa 1% (P/V) se pueden observar los productos de amplificación obtenidos a partir de las reacciones de PCR realizadas con las distintas combinaciones de cebadores. Las plantas 1, 2 y 3 son homocigotas para la inserción del ADN-T, mientras que la planta 4 no presenta la inserción, mostrando el mismo patrón de bandas que la planta salvaje Col-0. c) Verificación de la ausencia del transcripto *E2Fb* en las plantas *e2fb-1* homocigotas para la inserción del ADN-T. En la figura de la izquierda se muestran los productos de PCR obtenidos utilizando como molde ADNc de las plantas salvajes, mutantes homocigotas, el control negativo de la reacción de PCR y cebadores que amplifican el transcripto *RPL10A*, utilizados como control positivo de la integridad de los ADNc y de la reacción de PCR. En la figura de la derecha se puede observar que sólo hubo amplificación con los cebadores que hibridan en el transcripto *E2Fb* para la planta salvaje Col-0.



**Figura 3.45.** Identificación de plantas mutantes homocigotas de la línea SALK\_131064 (*e2fb-2*). a) Esquema del gen *E2Fb*. El ADN-T se encuentra inserto en el decimosegundo exón y el sitio de inserción se representa con un triángulo. Los rectángulos azules representan a los exones y las líneas azules a los intrones. Las regiones 5' y 3' UTR se indican con rectángulos celestes. b) Identificación de plantas mutantes homocigotas *e2fb-2*. En el gel de agarosa 1% (P/V) se pueden observar los productos de PCR obtenidos con las siguientes combinaciones de cebadores: 1) ADN-T/SALK\_131064 R; 2) ADN-T/SALK\_131064 L; y 3) SALK\_131064 R/SALK\_131064 L. c) Verificación de la ausencia del transcripto *E2Fb* en las plantas *e2fb-2* homocigotas para la inserción del ADN-T. En la figura de la izquierda se muestran los productos de PCR obtenidos utilizando cebadores que amplifican el transcripto *RPL10A*, y como molde ADNc de una planta salvaje Col-0, una planta mutante homocigota, otra planta salvaje utilizada como control positivo y el control negativo de la reacción de PCR. En la figura de la derecha se puede observar que sólo hubo amplificación con los cebadores que hibridan en el transcripto *E2Fb* para las plantas salvajes Col-0.

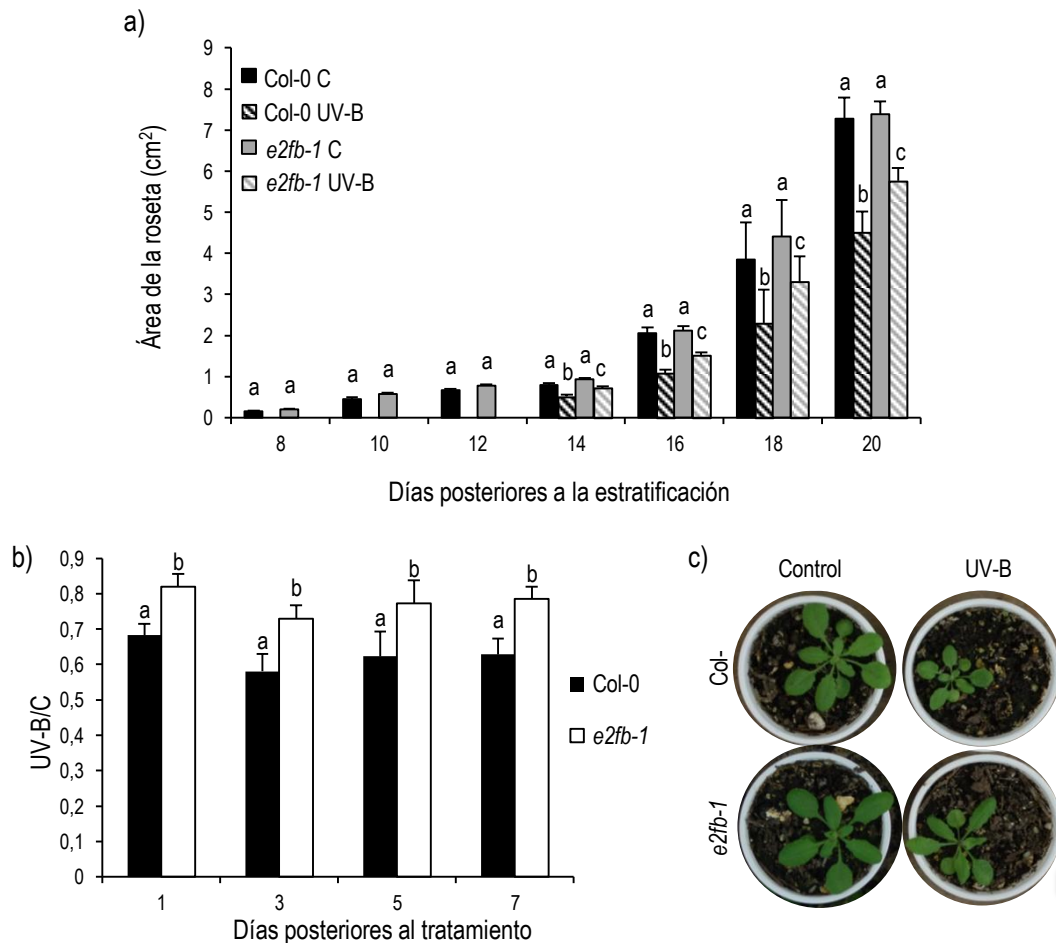
Por otro lado, las plantas de la línea *E2FbOE* presentan algunos fenotipos diferentes a los de las plantas salvajes Col-0 en condiciones normales de crecimiento. Estas observaciones fueron descritas por Sozzani y colaboradores (2006), quienes reportaron que las raíces de las plántulas transgénicas son significativamente más cortas que las de las plantas salvajes, y que sus cotiledones no presentan tricomas. Luego de haber verificado que la línea transgénica que nos fue cedida cuenta con estas características, procedimos a analizar las respuestas de estas plantas frente a la radiación UV-B. En la Figura 3.46 se muestra como ejemplo una fotografía de plántulas de 9 días, en donde se puede observar el fenotipo descrito para las raíces de la línea *E2FbOE*.



**Figura 3.46.** Fotografía de plántulas salvajes Col-0 y *E2FbOE* de 9 días, crecidas en medio MS-agar en posición vertical. La barra de escala representa 1 cm.

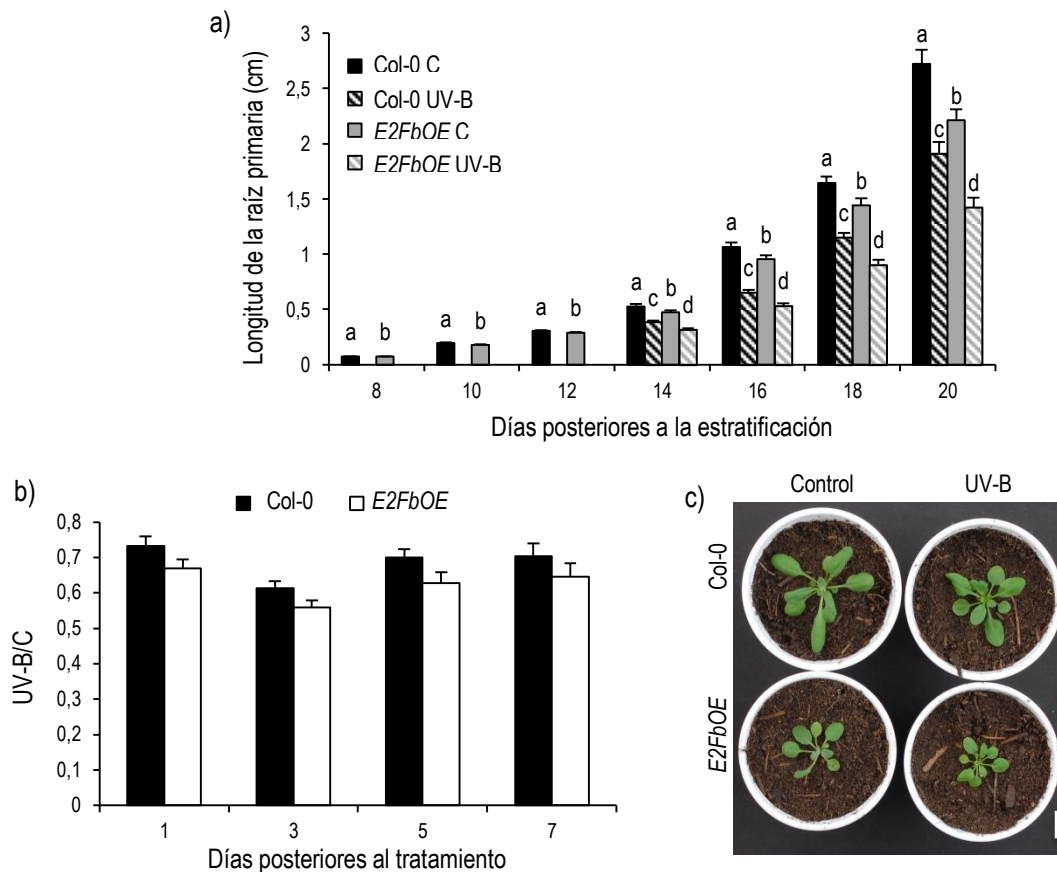
#### 3.3.2.1.2. La radiación UV-B afecta diferencialmente el crecimiento de las hojas de las líneas *e2fb-1* pero no el de las de plantas *E2FbOE*.

En primer lugar, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el área de la roseta de plantas mutantes *e2fb-1*. En condiciones control de crecimiento, el área promedio de la roseta de las plantas *e2fb-1* es similar al de las plantas salvajes Col-0; sin embargo, luego del tratamiento con UV-B, las plantas de la línea mutante presentan una menor inhibición del crecimiento de la roseta que las plantas salvajes (Figura 3.47).



**Figura 3.47.** a) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes y mutantes *e2fb-1* expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control (C). Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas y la barra de error representa el error estándar. b) Relación entre el promedio del área de plantas irradiadas con UV-B y el promedio de las plantas mantenidas en condiciones control para cada uno de los genotipos, en función de los días posteriores a los tratamientos. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas estadísticas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografía de plantas salvajes y *e2fb-1* de 21 días que fueron tratadas con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control, a los 12 días de crecimiento. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

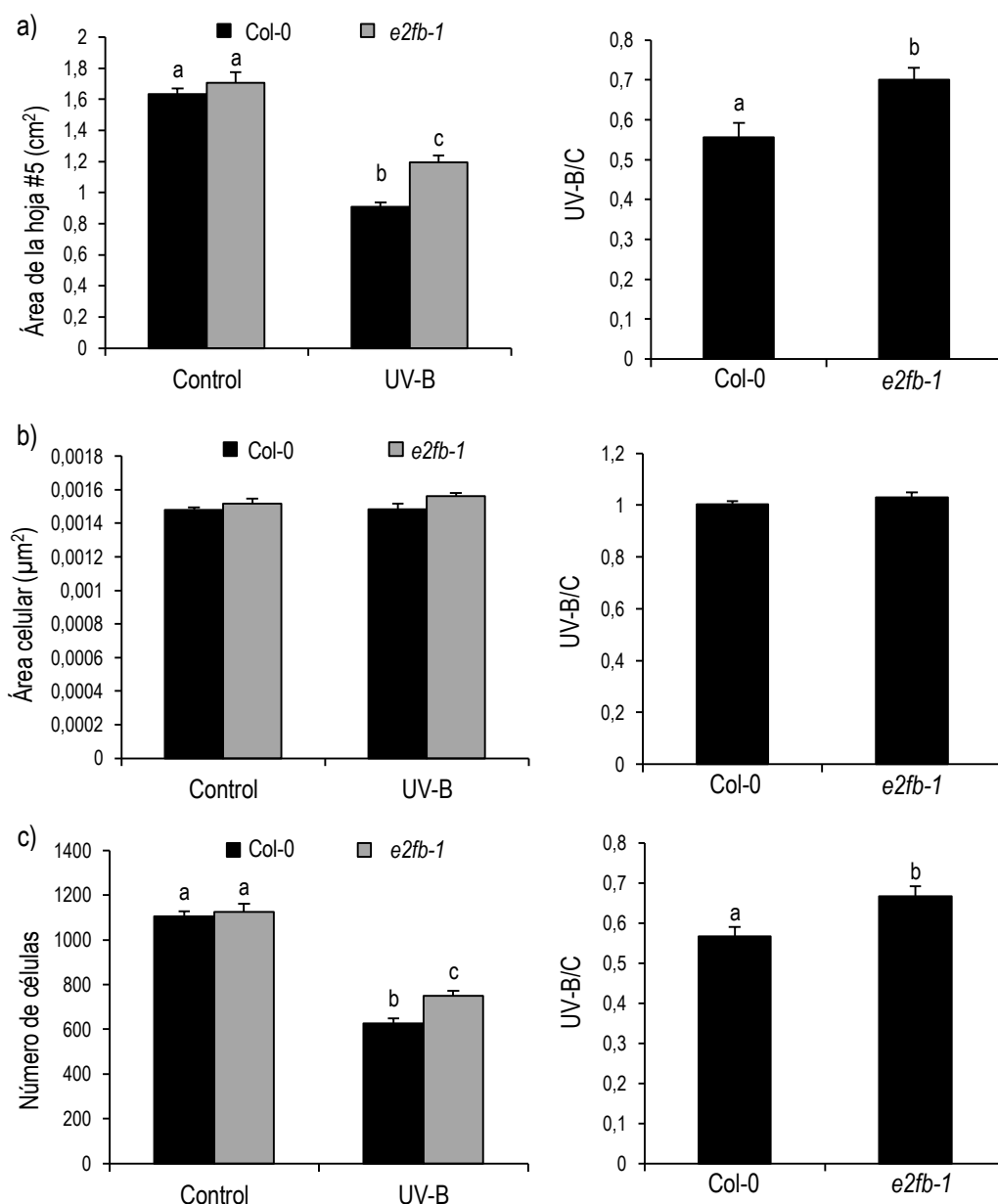
En segundo lugar, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de las rosetas de las plantas *E2FbOE*. Los resultados obtenidos muestran que, en ausencia de UV-B, el área promedio de las rosetas de las plantas transgénicas es menor que el área de las de plantas salvajes, y que luego del tratamiento con UV-B, la disminución del crecimiento es similar entre ambas líneas (Figura 3.48). Por lo tanto, la sobre-expresión de *E2Fb* no contribuye a regular el crecimiento de las hojas en condiciones de irradiación con UV-B.



**Figura 3.48.** a) Área de la roseta de plantas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FbOE* en función de los días posteriores a la estratificación, expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Área relativa (UV-B/C) de plantas Col-0 y *E2FbOE* en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras corresponden al promedio de 10 plantas y las barras de error representan al error estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba estadística ANOVA ( $p < 0,05$ ). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las relaciones UV-B/C al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografía de plantas salvajes y *E2FbOE* de 21 días que fueron tratadas con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control, a los 12 días de crecimiento. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Con el objetivo de determinar si la menor inhibición del crecimiento de las plantas *e2fb-1* luego del tratamiento con UV-B se debía a cambios en la proliferación celular y/o en la expansión celular, se analizaron las hojas #5 totalmente expandidas, que se encontraban constituidas por células en proliferación activa en el momento en el que se realizaron los tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones control, no hay diferencias en el área de las células del parénquima en empalizada ni en el número de células, como tampoco en el área de las hojas #5 entre las plantas salvajes y las mutantes (Figura 3.49). Sin embargo, en aquellas plantas que fueron irradiadas con UV-B, se observó que hay una marcada disminución en el área de las hojas #5, siendo la misma significativamente menor en las plantas *e2fb-1* que en las plantas salvajes, lo cual es coincidente con lo observado en el área de la roseta. A nivel microscópico, se determinó que las hojas #5 de las plantas

mutantes presentan una menor disminución en el número de células que las plantas salvajes Col-0, lo que se asocia con una menor inhibición de la proliferación celular, mientras que el área celular no es afectada por los tratamientos en ninguno de los dos genotipos (Figura 3.49).

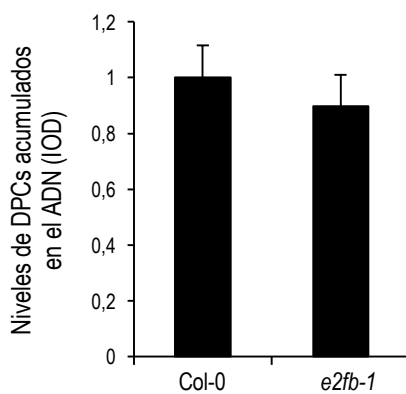


**Figura 3.49.** Análisis de las hojas #5. a) Área de las hojas #5, b) área de las células del parénquima en empalizada y c) número promedio de células del parénquima en empalizada de plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-1* irradiadas con UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el factor de transcripción E2Fb podría regular el crecimiento de las hojas frente a la exposición a la radiación UV-B, y que su actividad sería importante para el control de la proliferación celular bajo esta condición.

#### 3.3.2.1.3. Determinación de la acumulación del daño en el ADN en las plantas *e2fb-1*.

A continuación, se procedió a cuantificar el daño acumulado en el ADN luego de la exposición al UV-B, con el fin de determinar si el factor de transcripción E2Fb participa en la respuesta frente al daño en el ADN. En la Figura 3.50 se muestran los resultados obtenidos, que indican que las mutantes *e2fb-1* y las plantas salvajes Col-0 no presentan diferencias significativas en la acumulación de dímeros de pirimidina luego de la exposición con UV-B.

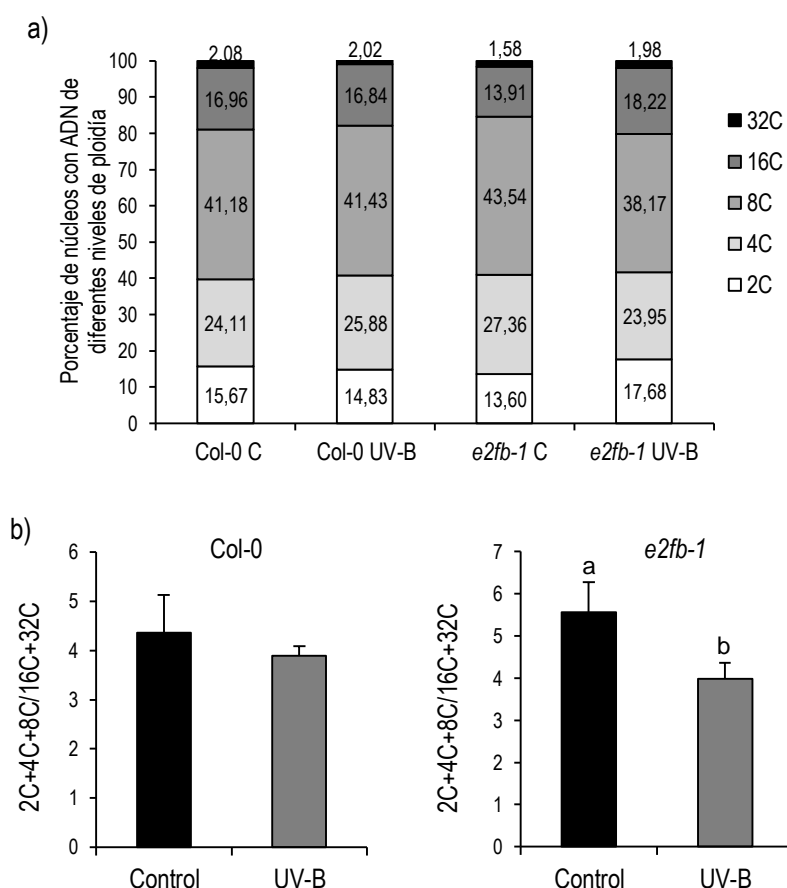


**Figura 3.50.** Cuantificación del daño acumulado en el ADN luego de la exposición al UV-B en las hojas de plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-1* mediante ensayos de dot blot. En el gráfico se representan los niveles promedio de DPCs acumulados en el ADN, relativizados al promedio obtenido en las plantas salvajes. Los promedios se calcularon a partir de seis grupos de plantas de 12 días de cada genotipo que fueron irradiadas con UV-B. Las barras de error corresponden al error estándar. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). Las plantas sometidas al tratamiento control no presentan daño cuantificable en el ADN. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 3.3.2.1.4. Los niveles de ploidía en la hoja #5 de las plantas *e2fb-1* se modifican por la exposición al UV-B.

Para investigar si la menor inhibición del crecimiento de las hojas por UV-B observado en las plantas *e2fb-1* se relaciona con cambios en los niveles de ploidía, se cuantificó el porcentaje de núcleos con diferentes niveles de ploidía en las hojas #5 de plantas salvajes y mutantes. Mientras que no se observaron diferencias significativas entre las hojas de las plantas salvajes que fueron irradiadas con UV-B y las que permanecieron en condiciones control, sí se observaron diferencias entre los niveles de ploidía de las hojas #5 de *e2fb-1* que recibieron los distintos tratamientos (Figura 3.51). En hojas irradiadas con UV-B, se observó un aumento significativo en el porcentaje de núcleos 16C y 32C, mientras que el porcentaje de núcleos 4C y 8C disminuye. Si bien esta diferencia no se ve reflejada al

calcular el Índice de Endorreduplicación, se puede notar al calcular el cociente entre la suma de los porcentajes de núcleos con ploidía 2C, 4C y 8C, y la suma de los que presentan niveles de ploidía 16C y 32C (Figura 3.51). Por lo tanto, los cambios observados en los niveles de ploidía luego de la exposición al UV-B podría conllevar a que las plantas mutantes *e2fb-1* toleren mejor la radiación UV-B. Es importante mencionar que no necesariamente un cambio en el nivel de ploidía se ve reflejado en un cambio en el área celular, o viceversa (Fina y col., 2017).



**Figura 3.51.** a) Porcentaje de núcleos que contienen ADN con distintos niveles de ploidía en las hojas #5 completamente expandidas de plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-1* que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Relación entre la suma del porcentaje de núcleos con niveles de ploidía 2C, 4C y 8C, y la suma del porcentaje de núcleos 16C y 32C. Las barras representan el promedio de triplicados biológicos y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento fue realizado por triplicado, obteniéndose resultados similares.

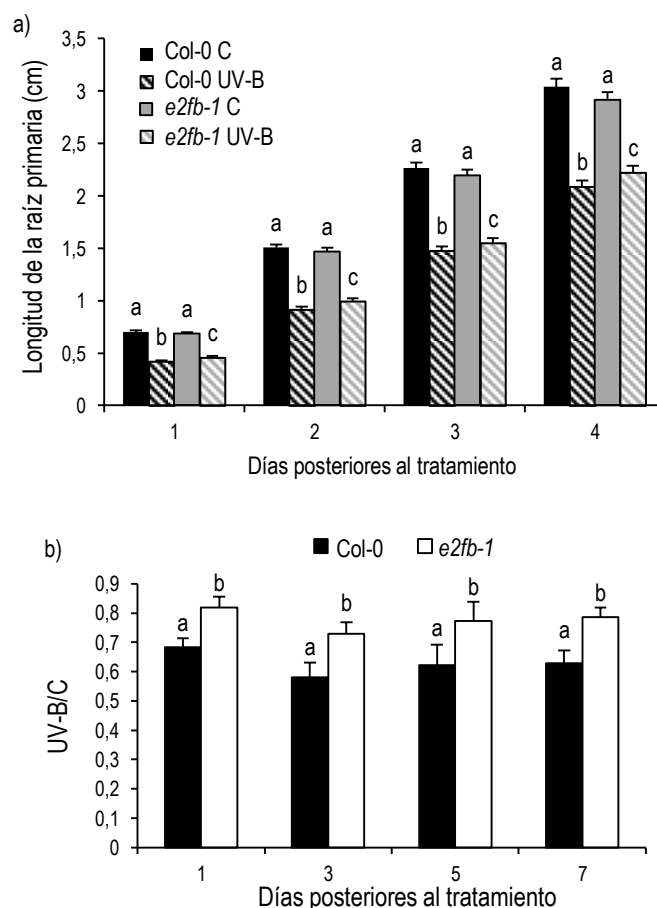
### 3.3.2.1.5. La radiación UV-B afecta diferencialmente el crecimiento de la raíz primaria de las plantas *e2fb-1*.

En primer lugar, cuando se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre la elongación de la raíz primaria de las plantas *e2fb-1*, no se observaron diferencias significativas entre el largo de la raíz primaria de las plantas mutantes y las salvajes en condiciones control, mientras que luego del

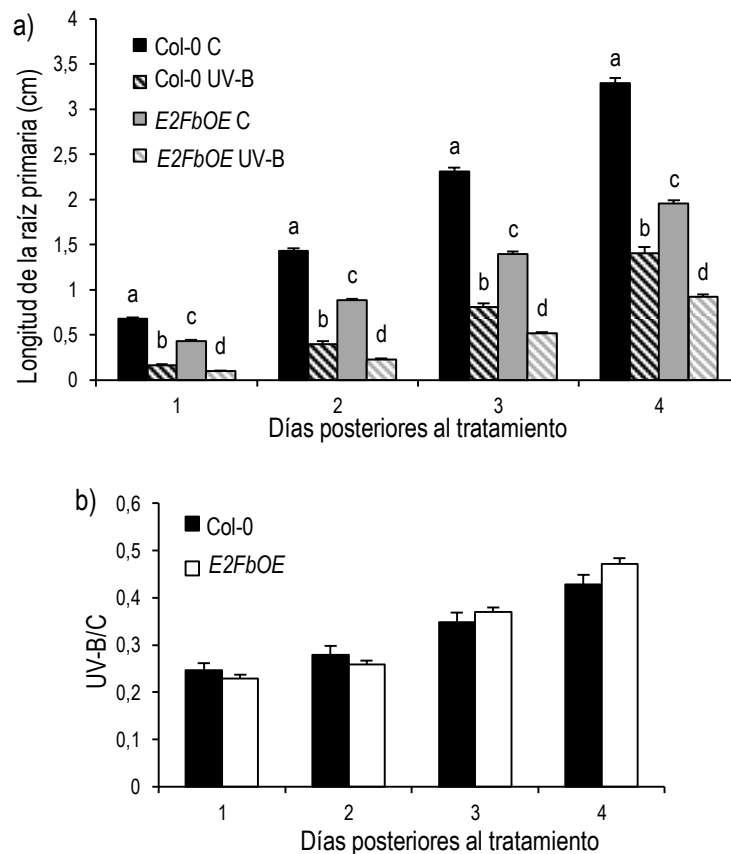


tratamiento con UV-B, las plantas mutantes muestran una menor inhibición del crecimiento de la raíz primaria que las plantas salvajes, lo cual es similar a lo observado en las hojas de estas plantas (Figura 3.52).

En cuanto al efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria de las plantas *E2FbOE*, como fue descrito previamente, en condiciones control de crecimiento, las raíces de estas plantas son significativamente más cortas que las de la línea salvaje. Luego de realizado el tratamiento con UV-B, se observó una disminución en la elongación de la raíz principal, siendo este efecto similar para las dos líneas en estudio (Figura 3.53). Por lo tanto, en concordancia con lo observado en las hojas, niveles elevados de *E2Fb* no producen un cambio en la respuesta de las raíces frente al UV-B, por lo que los resultados sugieren que los niveles celulares de *E2Fb* ya serían suficientes para desencadenar las respuestas observadas.



**Figura 3.52.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre la elongación de la raíz primaria en plántulas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-1* de 5 días. a) Longitud de la raíz primaria en función de los días posteriores al tratamiento control o con radiación UV-B. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en 30 raíces. b) Las barras representan el promedio de la relación entre la longitud de la raíz primaria de plantas tratadas con UV-B con respecto a la de las plantas tratadas en condiciones control, en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

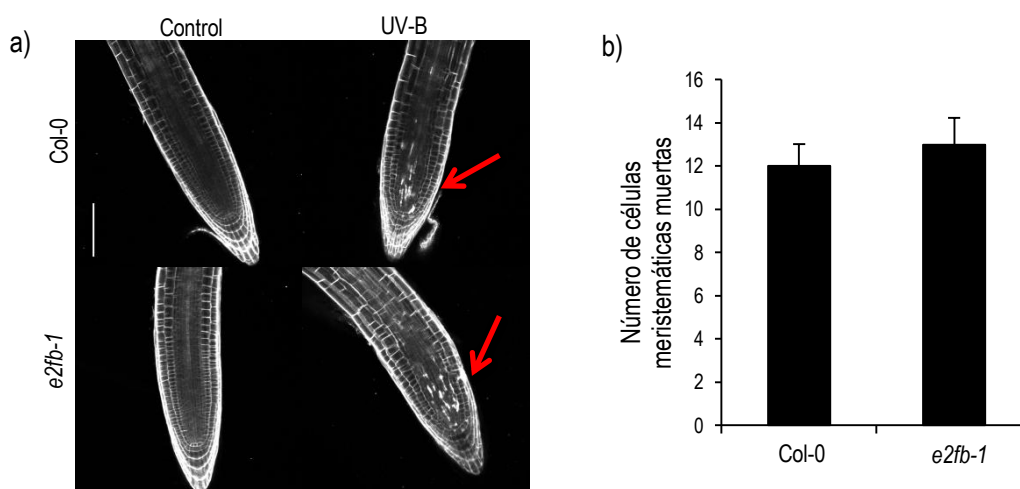


**Figura 3.53.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre la elongación de la raíz primaria en plántulas salvajes Col-0 y transgénicas *E2FbOE* de 5 días. a) Longitud de la raíz primaria en función de los días posteriores al tratamiento control o con radiación UV-B. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en 30 raíces. b) Las barras representan el promedio de la relación entre la longitud de la raíz primaria de plantas tratadas con UV-B con respecto a la de las plantas tratadas en condiciones control, en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA ( $p < 0,05$ ). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student para las relaciones UV-B/C ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

En segundo lugar, se evaluaron a nivel microscópico las raíces de las plantas salvajes Col-0 y de las plantas mutantes *e2fb-1*, en condiciones control y luego de recibir radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h. Los resultados obtenidos muestran que las raíces de las plantas salvajes y mutantes presentan cantidades similares de células meristemáticas muertas cuando son irradiadas con UV-B (Figura 3.54), mientras que en condiciones control, ninguna de las líneas en estudio presentó células muertas en el meristema radicular.

Por lo tanto, podemos concluir que el factor de transcripción E2Fb no participaría en el programa de muerte celular que se activa en la zona meristemática cuando las raíces son expuestas al UV-B, lo cual es coincidente con lo reportado por Horvath y colaboradores (2017). Por el contrario, podrían producirse alteraciones en las células que forman parte de la zona de elongación, ya que es allí donde se expresa principalmente *E2Fb* (Sozzani y col., 2006), pudiendo ser ésta la razón por la que las

plantas mutantes *e2fb-1* presentan el fenotipo de menor inhibición del crecimiento en la raíz primaria. Sin embargo, debería estudiarse a nivel microscópico dicha zona, con el fin investigar si la hipótesis es válida.

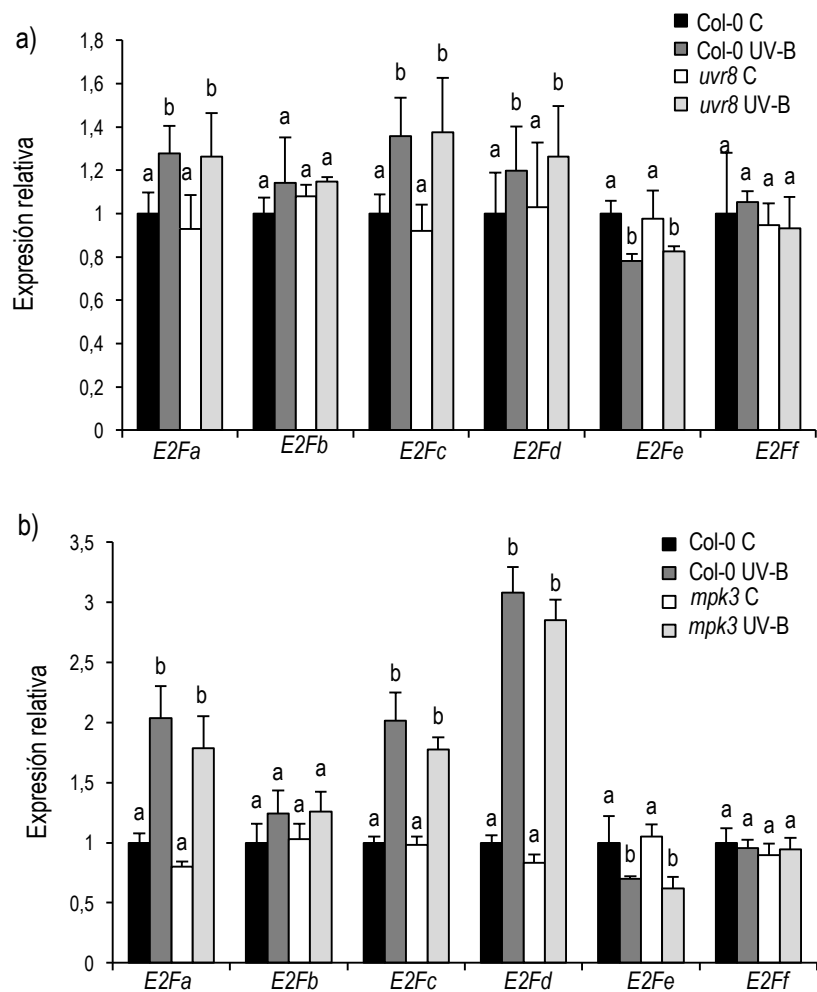


**Figura 3.54.** Análisis del efecto de la radiación UV-B sobre las células del meristema radicular de plántulas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-1*. a) Fotografías tomadas con el microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) de raíces en condición control o tratadas con UV-B durante 1 h, luego de ser teñidas con Ioduro de Propidio. Las flechas indican las células meristemáticas muertas. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . b) Gráfico que representa el número promedio de células meristemáticas muertas por raíz para las líneas Col-0 y *e2fb-1*. Las barras representan el promedio de 40 raíces analizadas y las barras de error corresponden al error estándar. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.4. Análisis de la expresión de los factores de transcripción E2Fs en las plantas mutantes *uvr8* y *mpk3*.

Por último, se analizó si la expresión de *E2Fc* y *E2Fb*, como así también la de los demás *E2Fs* pertenecientes a la vía del Retinoblastoma, se encuentra modulada por la vía del fotorreceptor UVR8. Para ello, se realizaron ensayos de RT-qPCR utilizando como molde ADNc obtenido a partir de hojas #5 de plantas mutantes *uvr8* y salvajes Col-0, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento. La expresión de *E2Fc* y *E2Fb* es similar en las plantas salvajes y las mutantes, tanto en condiciones control como luego de la exposición al UV-B (Figura 3.55a). Al igual que como fue reportado previamente, la expresión de *E2Fc* aumenta significativamente cuando las plantas son irradiadas con UV-B, mientras que la expresión de *E2Fb* no se modifica por los tratamientos (Fina y col., 2017). Con respecto a la expresión de los demás factores de transcripción de la familia E2F, no se observaron diferencias entre las líneas en ninguna de las dos condiciones ensayadas (Figura 3.55a). Es importante mencionar que, Casadevall y colaboradores (2013) reportaron que los niveles de expresión del *miR396* en las plantas mutantes *uvr8* son similares a los de las plantas salvajes, tanto en condiciones control como luego de la exposición a la luz UV-B. Por lo tanto, el fenotipo de menor inhibición de la proliferación celular en las plantas *MIM396*, también es independiente de la vía del fotorreceptor UVR8.

Por otra parte, los mismos ensayos se realizaron utilizando plantas mutantes *mpk3*, ya que las respuestas mediadas por el *miR396* frente a la radiación UV-B dependen de esta proteína quinasa (Casadevall y col., 2013). Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias en la expresión de los factores de transcripción E2Fs entre la línea mutante y la salvaje, en ninguna de las dos condiciones ensayadas, lo que indica que la regulación de la expresión de *E2Fc* y de *E2Fb* sería independiente de la vía de la MPK3 (Figura 3.55b). Por lo tanto, la expresión de *E2Fc* y de *E2Fb* en condiciones de UV-B podría estar regulada por otras vías alternativas que se activan en respuesta a esta radiación, como son las vías de señalización del daño en el ADN, la vía de la proteína quinasa MPK6 o la señalización llevada a cabo por hormonas (González Besteiro y col., 2011; González Besteiro y Ulm, 2013; Yoshiyama y col., 2013a; Jenkins, 2017).



**Figura 3.55.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de los transcriptos de cada uno de los *E2F*, en las hojas #5 de a) las plantas mutantes *uvr8*, b) las plantas mutantes *mpk3* y las plantas salvajes Col-0 (a y b), sometidas a tratamientos con radiación UV-B o en condiciones control. Las barras representan la expresión promedio relativizada al promedio obtenido para las plantas salvajes en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por duplicado, obteniéndose resultados similares.

### 3.5. DISCUSIÓN

Debido a que las plantas son organismos sésiles y se encuentran expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, sus patrones de crecimiento son extremadamente dinámicos debido a que deben adaptarse al ambiente que las rodea. En este capítulo analizamos el efecto de la radiación UV-B en la proliferación celular en plantas de *A. thaliana* salvajes y con alteraciones en la expresión de diferentes factores de transcripción, así como también en el microARN 396. Para ello, nos basamos en investigaciones realizadas previamente por el grupo de trabajo, las cuales permitieron demostrar que cuando las plantas son irradiadas con UV-B, utilizando una intensidad de luz similar a la percibida durante el verano en la ciudad de Rosario, se produce inhibición en el crecimiento de las hojas y de las raíces (Casadevall y col., 2013; Fina y col., 2017).

La reducción en el tamaño de las hojas en respuesta al UV-B ocurre como consecuencia de la inhibición de la proliferación celular en aquellas hojas que se encuentran en la fase inicial del desarrollo y que están constituidas mayoritariamente por células en proliferación activa. Esta inhibición es, en parte, regulada por el miR396 que reprime la expresión de los factores de transcripción de la familia GRF (Casadevall y col., 2013). En relación a este fenotipo, Radziejowski y colaboradores (2011) demostraron que el factor de transcripción E2Fe/DEL1 también modula el crecimiento de las hojas de *Arabidopsis* bajo condiciones de iluminación con UV-B, al regular la expresión de la enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs que se forman en el ADN y el inicio del endociclo (Vlieghe y col., 2005). En este capítulo, se propuso investigar si la función de E2Fe en respuesta a la radiación UV-B es regulada por E2Fc y E2Fb, ya que *E2Fe* es un blanco de regulación para estos factores de transcripción (Berckmans y col., 2011).

Por un lado, los resultados obtenidos demuestran que E2Fc modula el crecimiento de las plantas bajo condiciones de iluminación con UV-B, pero de manera diferente a como lo hace E2Fe. Esto se debe a que las plantas deficientes en la expresión de *E2Fc* y *E2Fe* muestran menor inhibición del crecimiento de las hojas que las plantas salvajes Col-0, pero debido a mecanismos moleculares distintos. Mientras que las hojas de las plantas mutantes *E2Fe*<sup>KO</sup> acumulan menor daño en el ADN y presentan células con mayores niveles de ploidía luego de la exposición al UV-B (Radziejowski y col., 2011), las plantas *E2FcRNAi* acumulan cantidades similares de DPCs en su ADN que las plantas salvajes Col-0, y presentan mayor cantidad de células con niveles de ploidía más bajos. A pesar de que las células en proliferación activa en las plantas *E2FcRNAi* presentan niveles incrementados de *E2Fe*, la respuesta a la radiación UV-B podría deberse a la modificación en la regulación de la expresión de otros genes, como son *ATR* y *SOG1*, que participan en las vías de respuesta frente al daño en el ADN. Además, tanto E2Fb como E2Fc regulan de manera antagonista la expresión de *E2Fe* en presencia de luz (Berckmans y col., 2011), por lo que es posible que bajo condiciones de iluminación con UV-B, las respuestas medidas por E2Fe estén reguladas mayoritariamente por E2Fb u otro factor de transcripción. Un indicio de esto son los resultados obtenidos con las plantas mutantes *e2fb-1*, las

cuales muestran menor inhibición en el crecimiento de las hojas luego de la exposición a la radiación UV-B, hecho que podría deberse a los cambios en los niveles de ploidía observados en los núcleos extraídos de hojas. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en los niveles de DPCs acumulados en el ADN entre esta línea mutante y la línea salvaje Col-0, indicando que otros factores de transcripción regularían la expresión de *E2F* para activar la transcripción de *UVR2* y reparar el daño producido en el ADN.

Por otro lado, evidenciamos que a pesar de que *E2Fc* no participa directamente en la reparación del ADN, este factor de transcripción cumple un rol en la respuesta frente al daño en el ADN debido a que las plantas *E2FcRNAi* presentan un menor número de células muertas en el meristema radicular en comparación con las plantas salvajes Col-0 luego de la exposición al UV-B. Las plantas activan el programa de muerte celular cuando las células, particularmente las del meristema, no logran reparar el daño en el ADN (d'Adda di Fagagna, 2008; Falcone Ferreyra y col., 2016). Este mecanismo de respuesta es activado por el factor de transcripción *SOG1*, de manera dependiente de las proteínas quinasas *ATM* y *ATR*. Si bien *ATR* reconoce mayoritariamente rupturas doble hebra en el ADN, mientras que *ATR* reconoce principalmente rupturas simple hebra y defectos que impiden la replicación del ADN (Culligan y Britt, 2008; Flynn y Zou, 2011), las plantas mutantes *atm* y *atr* expuestas al UV-B muestran gran cantidad de células muertas en el meristema radicular, lo que sugiere que ambas proteínas quinasas están involucradas en la activación de la muerte celular por este tipo de radiación. Por el contrario, las plantas mutantes *sog1-1* son deficientes en esta respuesta, lo que indica que *SOG1* también cumple un rol fundamental en la activación de la muerte celular programada luego de la exposición al UV-B (Furukawa y col., 2010). Además, estas plantas mutantes presentan reprimida la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, como *CDKB2;1* y *Knolle* luego de ser expuestas al UV-B, sugiriendo que *SOG1* también participaría en el arresto del ciclo celular inducido por el daño en el ADN (Yoshiyama y col., 2009). Por lo tanto, la expresión alterada de ciertos genes del ciclo celular en las plantas *E2FcRNAi* expuestas al UV-B podría estar mediada por la regulación de la expresión de *SOG1* por *E2Fc*, la cual también se encuentra alterada en estas plantas. Además, tanto *SOG1* como *ATR* presentan en sus regiones promotoras sitios consenso de unión para factores de transcripción de la familia *E2F*, y aunque la interacción *in vivo* aún debe ser demostrada, *E2Fc* podría regular el crecimiento de las plantas y la respuesta frente al daño en el ADN luego de la exposición al UV-B, al regular la expresión de *SOG1* y *ATR*. De esta manera, *E2Fc* intervendría en la muerte celular sin tener un rol directo en la reparación del daño en el ADN, lo cual también explicaría el fenotipo de menor inhibición del crecimiento de la raíz primaria, observado en las plantas *E2FcRNAi* que fueron irradiadas con UV-B.

Por el contrario, si bien las plantas mutantes *e2fb-1* muestran también un fenotipo de menor inhibición de la elongación de la raíz primaria luego de la exposición al UV-B, la cantidad de células muertas en el meristema radicular es similar a la que presentan las raíces de plantas salvajes Col-0.

Esta respuesta podría relacionarse con el patrón de expresión que presenta *E2Fb* en las raíces, así como también con la función de sus genes blanco. Por un lado, Sozzani y colaboradores (2006) demostraron que *E2Fb* se expresa en la zona de elongación del meristema radicular y también en los primordios de las raíces laterales, pero se encuentra excluido de la zona de división celular. Por otro lado, Horvatz y colaboradores (2017) reportaron que, en las raíces de *A. thaliana*, RBR cumple un rol fundamental en la protección de la integridad del genoma en las células meristemáticas durante la transición hacia la fase S, y este rol sería junto a E2Fa sin la participación de E2Fb. De esta manera, cuando se activa la vía de respuesta frente al daño en el ADN luego de, por ejemplo, una ruptura doble hebra, RBR y E2Fa, pero no E2Fb, serían reclutadas hacia el sitio del daño de manera dependiente de ATM, junto con otras proteínas de señalización y reparación del ADN. En particular, BRCA1, una proteína de reparación del ADN, interaccionaría con RBR para proteger al genoma. Además, el complejo RBR/E2Fa, actúa como represor transcripcional de *BRCA1*, mientras que E2Fb no participa de esta regulación (Horvatz y col., 2017). Por lo tanto, E2Fb no regularía la muerte celular en el meristema radicular, y el fenotipo observado en las raíces de las plantas mutantes *e2fb-1* podría deberse a alteraciones en el crecimiento de las células presentes en la zona de elongación. No obstante, otros experimentos deberían llevarse a cabo para confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, determinamos que la sobre-expresión de los factores de transcripción E2Fb y E2Fc no modifican las respuestas de las plantas al UV-B analizadas durante este trabajo de Tesis. Si bien cada una de las líneas transgénicas presenta fenotipos particulares en condiciones control, lo que demuestra la importancia de sus funciones durante el crecimiento y el desarrollo, su acumulación no presenta una ventaja frente a la exposición a la radiación UV-B. En consecuencia, la regulación de la expresión efectuada por E2Fb y E2Fc sobre sus genes blanco es importante en las respuestas frente al UV-B, y probablemente sólo requieran de niveles de expresión basales de estos factores de transcripción, como ocurren normalmente en las células.

Además, se demostró que la regulación de la proliferación celular mediada por el miR396 luego de la exposición al UV-B requiere de la actividad del factor de transcripción E2Fc. En plantas de *A. thaliana*, la radiación UV-B induce la expresión y acumulación del miR396 en células en proliferación activa, lo que conlleva a una disminución en la expresión de los factores de transcripción *GRF1*, *GRF2* y *GRF3* (Casadevall y col., 2013). En este trabajo de Tesis, se demostró que los niveles del miR396 también aumentan en las plantas *E2FcRNAi* luego de ser expuestas a la luz UV-B, pero lo hacen en menor medida que en las plantas salvajes Col-0. Al realizar cruza entre las líneas transgénicas *MIM396* y *E2FcRNAi*, se observó que tanto las plantas *MIM396xE2FcRNAi* como las *E2FcRNAixMIM396* son fenotípicamente similares a su parental *E2FcRNAi*, tanto en condiciones control de crecimiento como luego de la exposición con UV-B. Así mismo, mientras que las plantas *MIM396* acumulan menores niveles de DPCs en su ADN, las plantas *MIM396xE2FcRNAi* y *E2FcRNAixMIM396* poseen niveles de DPCs similares a los de las plantas *E2FcRNAi* y salvajes Col-0. De la misma manera, la expresión de



los genes *GRF1*, *GRF2* y *GRF3* es similar entre las plantas *MIM396xE2FcRNAi*, *E2FcRNAi* y salvajes Col-0 en condiciones control, mientras que se reprime de manera similar en estas líneas luego de la exposición al UV-B. Sin embargo, en las plantas *MIM396*, estos transcriptos están aumentados en condiciones control, y su expresión no es reprimida por el UV-B (Debernardi y col., 2012; Casadevall y col., 2013). Por lo tanto, la regulación pos-transcripcional de los GRFs llevada a cabo por el miR396, es contrarrestada por los bajos niveles de E2Fc, por lo que E2Fc actuaría epistáticamente sobre el miR396.

Los resultados presentados en esta Tesis también demuestran que la regulación de la proliferación celular luego de la exposición al UV-B es independiente de la regulación ejercida por los factores de transcripción TCP de clase II en plantas de *Arabidopsis*. Los TCP2, TCP3, TCP4, TCP10 y TCP24 participan en el control del desarrollo de las hojas y activan la expresión del miR396b (Palatnik y col., 2003; Schommer y col., 2014); sin embargo, las plantas cuádruple mutantes *tcp2x3x4x10* presentaron fenotipos de respuesta al UV-B similares a los de las plantas salvajes Col-0.

Finalmente, se observó que la expresión de los factores de transcripción E2F, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B, no se modifica en las plantas mutantes *uvr8* o *mpk3*. De esta manera, las respuestas mediadas por E2Fc y E2Fb descritas en este trabajo son independientes de estas vías de regulación de respuesta al UV-B.

Por lo tanto, los resultados detallados en este capítulo dejan en evidencia que existe una compleja red regulatoria integrada por diferentes vías encargadas de mantener el balance entre la proliferación y la diferenciación celular en plantas, con el fin de permitir su crecimiento bajo elevada radiación UV-B, y al mismo tiempo asegurar la integridad del genoma.

## Capítulo 4

Rol de las proteínas FAS1 y FAS2 en las  
respuestas a la radiación UV-B en plantas  
de *Arabidopsis thaliana*.



## CAPÍTULO 4

### 4.1. OBJETIVOS

#### 4.1.1. Objetivo general

Estudiar el rol de las proteínas FAS1 y FAS2, componentes del complejo CAF-1, en las respuestas a la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana* con el propósito de identificar mecanismos que participen en la adaptación a esta radiación.

#### 4.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente plantas de *A. thaliana* mutantes en los genes *FAS1* y *FAS2* en condiciones control de crecimiento y luego de la exposición a la radiación UV-B.
- Evaluar el efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de las hojas y de las raíces de plantas salvajes y mutantes en los genes *FAS*.
- Estudiar a nivel molecular el rol del complejo CAF-1 en la reparación del daño en el ADN, en la acumulación de pigmentos fotoprotectores, y en la regulación de la expresión génica en respuesta a la radiación UV-B en Arabidopsis.

## 4.2. INTRODUCCIÓN

Las plantas se encuentran continuamente expuestas a cambios en el ambiente que impactan sobre sus programas de desarrollo. Uno de esos factores ambientales es la luz UV-B, la cual, a elevadas dosis, produce efectos severos sobre las biomoléculas, lo que ocasiona cambios en la morfología y fisiología de las plantas. Como se mencionó en la sección 1.2, en lo que respecta al daño en el ADN, la radiación UV-B induce la formación de DPCs y, en menor medida, 6-4 PPs (Friedberg y col., 1995). Estas lesiones interrumpen los procesos de replicación y transcripción, por lo que las mismas deben ser reparadas para mantener la integridad del genoma, el crecimiento de la planta y la viabilidad de las semillas (Britt, 1996). Para que la maquinaria de reparación pueda acceder y reparar el ADN dañado, es necesario modificar la estructura de la cromatina. Esta puede ser remodelada de diferentes maneras, entre las que se encuentra el proceso de ensamblado y desensamblado de los nucleosomas, que es llevado a cabo por diferentes chaperonas de histonas (Park y Luger, 2008; Avvakumov y col., 2011).

Uno de los complejos que actúa como chaperona de histonas tipo H3-H4 es el complejo heterotrimérico CAF-1, constituido por las proteínas FAS1 (subunidad mayor), FAS2 (subunidad mediana) y MSI1 (subunidad pequeña) (Leyser y Furner, 1992; Kaya y col., 2001). Este complejo participa en el ensamblado de la cromatina acoplado a la replicación durante la fase S y en la reparación del daño en el ADN, al interaccionar con la proteína nuclear PCNA (del inglés Antigen Proliferating Cell Nuclear), un factor accesorio del complejo de la ADN polimerasa (Figura 4.1; Mello y Almouzni, 2001; Loyola y Almouzni, 2004). Además, CAF-1 es requerido para la organización de la heterocromatina y el agregado y el mantenimiento de marcas epigenéticas en las histonas, lo que se asocia con la regulación de la expresión génica (Schönrock y col., 2006; Ramirez-Parra y Gutierrez, 2007a).

Existen numerosas evidencias acerca de la participación de CAF-1 en las respuestas frente al daño en el ADN. Las plantas mutantes *fas1* y *fas2* de *Arabidopsis* presentan un incremento en las rupturas de doble hebra del ADN, así como también en la frecuencia de recombinación homóloga, entre otras alteraciones a nivel nuclear, debido a que la cromatina se encuentra en una conformación más laxa con respecto a la de las plantas salvajes (Endo y col., 2006; Kirik y col., 2006; Schönrock y col., 2006; Mozgová y col., 2010). Asimismo, las plantas mutantes *fas* presentan inducida la expresión de los genes que participan de la reparación de las rupturas doble hebra, y un incremento en la fosforilación de las histonas H2AX ( $\gamma$ -H2AX), una marca que indica este tipo de daño. Además, las mismas presentan aumentados los niveles de los transcriptos *BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1 (BRCA1)*, *RADIATION SENSITIVE 51 (RAD51)* y *POLY ADP-RIBOSE POLYMERASE 1 (PARP1)*, entre otros, que son característicos del punto de control del daño al ADN en la fase G2, y algunas de estas proteínas también intervienen directamente en el proceso de recombinación homóloga (Kirik y col., 2006; Endo y col., 2006; Ramirez-Parra y Gutierrez 2007a y 2007b). Sin embargo, estas plantas no

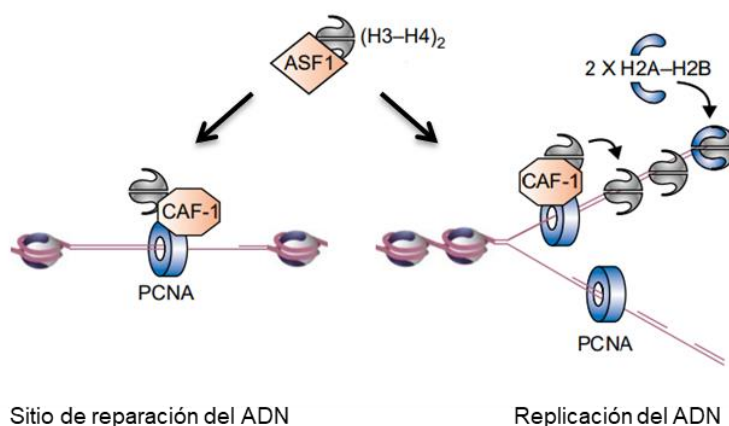
presentan modificaciones en el nivel del transcripto *Ku70*, el cual participa en el punto de control en G1 y del sistema de reparación por unión de extremos no homólogos, lo que sugiere que no se produce un cambio global en el remodelado de la cromatina, sino que es una consecuencia de cambios epigenéticos selectivos en la acetilación y metilación de la histona H3 en los promotores de dichos genes (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007a).

En relación a lo descrito anteriormente, la pérdida de función del complejo CAF-1 en levaduras conduce a un arresto temporal del ciclo celular, con retraso en la fase G2; mientras que en células de mamíferos se produce el arresto del ciclo celular en esta fase, seguido de la muerte celular (Hoek y Stillman, 2003; Prado y col., 2004). Por el contrario, en *Arabidopsis*, la detención en G2 induce un cambio desde el ciclo celular mitótico hacia el endociclo, lo que conlleva a que las plantas mutantes *fas* tengan menos células pero de mayor tamaño y con mayores niveles de ploidía (Exner y col., 2006; Kirik y col., 2006; Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007a; Otero y col., 2014). Mediante diversos análisis genéticos, Hisanaga y colaboradores (2013) demostraron que la disminución en el número de células en las hojas de las plantas mutantes *fas* y la activación de la respuesta al daño en el ADN son dependientes de la proteína quinasa ATM, la cual dispararía el arresto del ciclo celular, promoviendo el inicio del endociclo; mientras que los defectos observados en las raíces de estas plantas dependería tanto de la actividad de ATM como de ATR. Además, se ha demostrado que la expresión de los genes *FAS* varía durante el ciclo celular, presentando un pico máximo de expresión durante la fase S (Kaya y col., 2001). Por otra parte, las regiones promotoras de los genes *FAS2* y *MSI1* contienen un único sitio consenso de unión para los factores de transcripción de la familia E2F, mientras que *FAS1* presenta dos, uno de ellos requerido para la activación de la expresión y el otro para la represión de la misma (Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007a).

La participación de CAF-1 en los distintos procesos nucleares hace que este complejo contribuya a la plasticidad de las plantas y sea importante en el desarrollo de las mismas. Como fue descrito anteriormente y como se detalla en la sección 1.3 de la Introducción, si bien las plantas mutantes *fas1* y *fas2* son viables y fértiles, presentan alteraciones en diversos mecanismos moleculares. En consecuencia, poseen defectos en los meristemas, lo que conlleva a la pérdida de la filotaxis, produciendo hojas estrechas y aserradas, al crecimiento reducido de la raíz principal, y a alteraciones en la estructura de los órganos florales (Leyser y Funder, 1992). Sin embargo, las plantas mutantes homocigotas *msi1* son letales, quizás debido a que *MSI1* también forma parte de otros complejos, como por ejemplo de PRC2 (del inglés Polycomb Repressive Complex 2), encargado de trimetilar la lisina 27 de las histonas H3 (Exner y col., 2006; Dotto y col., 2018).

Si bien se ha investigado sobre las respuestas de las plantas mutantes en el complejo CAF-1 frente a distintos agentes genotóxicos, como la radiación  $\gamma$ , el peróxido de hidrógeno y la radiación UV-C (Endo y col., 2006; Kirik y col., 2006; Varas y col., 2015; Varas y col., 2017), el rol de CAF-1 en las respuestas frente al daño en el ADN causado por la radiación UV-B, que mayoritariamente genera dímeros de

primidina, no ha sido estudiado. Por lo tanto, nos propusimos evaluar si las proteínas FAS1 y FAS2 participan de estas respuestas cuando las plantas son expuestas a la luz UV-B.



**Figura 4.1.** Modelo del ensamblado de los nucleosomas mediado por CAF-1. El ensamblado de los nucleosomas *de novo* implica la deposición del tetrámero de histonas  $(H3-H4)_2$ , mediante un proceso que involucra al complejo CAF-1, seguido de la adición de los heterodímeros H2A-H2B. La especificidad para dirigir el ensamblado de los nucleosomas reside en la interacción de CAF-1 con PCNA, tanto en el sitio donde ocurrió la reparación del ADN (izquierda) como en el nuevo ADN sintetizado (derecha). Además, la chaperona de histona ASF1 es la encargada de transferir el tetrámero de histonas  $(H3-H4)_2$  hacia CAF-1. Adaptado de Mello y Almouzni (2001), y Ramirez-Parra y Gutierrez (2007b).

### 4.3. RESULTADOS

Los resultados que se describen a continuación corresponden a experimentos realizados con plantas de las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4*. Se obtuvieron resultados similares con la línea mutante *fas2-3*, los cuales se presentan en el Anexo.

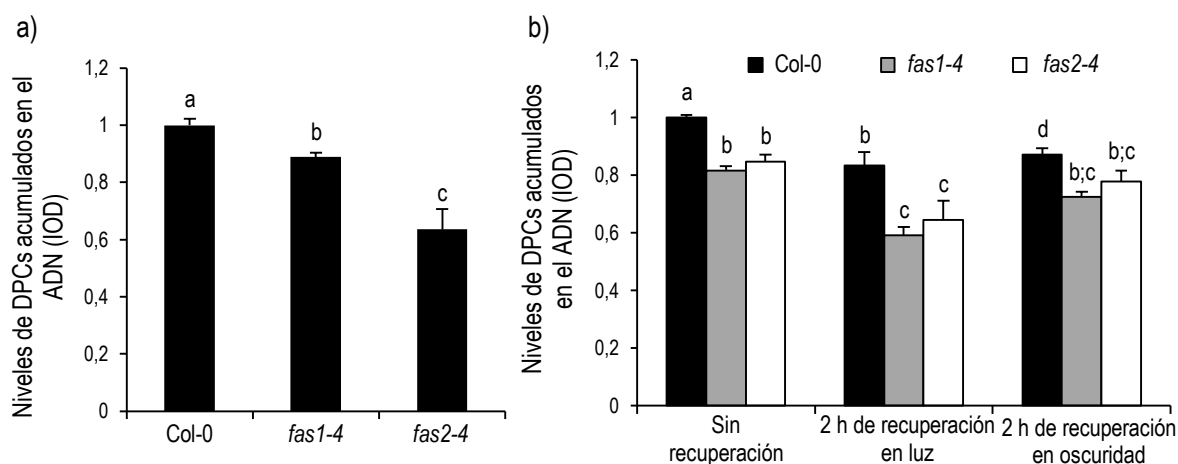
#### 4.3.1. Las plantas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* acumulan menor cantidad de daño en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B.

Con el objetivo de investigar si el complejo CAF-1 participa en las respuestas frente al daño en el ADN causado por la radiación UV-B, comenzamos nuestros estudios evaluando los niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas de plantas salvajes Col-0 y de plantas mutantes *fas*. Para ello, se realizaron ensayos de dot blot como se describe en la sección 2.11 de Materiales y Métodos.

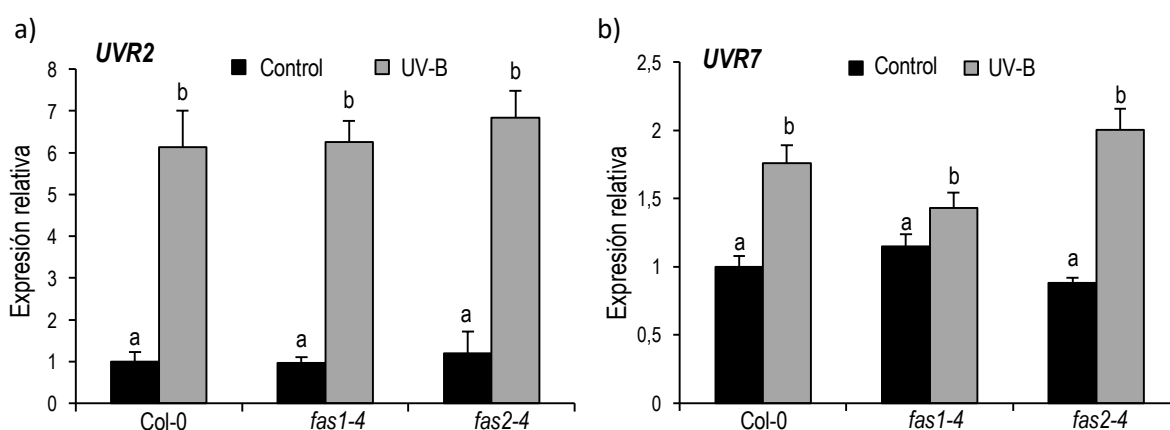
Los resultados obtenidos muestran que luego de 4 h de exposición a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) en presencia de luz blanca, la cual permite la reparación de las lesiones en el ADN por fotorreactivación, las plantas mutantes *fas* acumulan menor cantidad de DPCs que las plantas salvajes Col-0 (Figura 4.2a). Esta diferencia también se observó cuando el tratamiento con UV-B se realizó en oscuridad, condiciones en las que la fotoliasa no se encuentra activa, e incluso en aquellas plantas que 2 h luego de finalizado este tratamiento permanecieron bajo luz blanca o en oscuridad para su recuperación (Figura 4.2b). En los tratamientos control, realizados en ausencia de UV-B, no se evidenció daño cuantificable en el ADN en ninguna de las líneas bajo estudio. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las lesiones en el ADN causadas por la radiación UV-B son reparadas más eficientemente en las plantas deficientes en la expresión de *FAS1* y *FAS2* que en las plantas salvajes Col-0. Sin embargo, esto es opuesto a lo reportado previamente utilizando otros tipos de agentes genotóxicos que producen rupturas en el ADN (Endo y col., 2006; Kirik y col., 2006; Varas y col., 2015; Varas y col., 2017).

A continuación, para analizar si la mayor reparación del ADN se debe a que las mutantes en CAF-1 expresan mayores niveles de las enzimas que participan en esta reparación, se evaluaron mediante ensayos de RT-qPCR los niveles de los transcritos de *UVR2* y *UVR7* en hojas de plantas salvajes Col-0 y de plantas mutantes *fas*. Como se mencionó en la sección 1.2.2.1, estos genes codifican para una enzima fotoliasa encargada de reparar los DPCs, y para una enzima homóloga a ERCC1 de humanos perteneciente al sistema NER, respectivamente. En ausencia de UV-B, los niveles de los transcritos son bajos y similares entre los genotipos, y si bien ocurre un aumento en la expresión de *UVR2* y *UVR7* luego de 4 h de irradiación con UV-B, el incremento es similar entre las líneas en estudio (Figura 4.3a y b). En consecuencia, estos resultados sugieren que CAF-1 no regularía la expresión de las enzimas encargadas de reparar los DPCs, sino que la capacidad de las plantas *fas* de reparar este

tipo de daño podría deberse al rol que cumple este complejo en la regulación del estado de condensación de la cromatina.



**Figura 4.2.** Determinación del daño en el ADN causado por la radiación UV-B en plantas salvajes Col-0 y en plantas de las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, mediante ensayos de dot blot. a) Niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas salvajes Col-0 y mutantes *fas* luego de 4 h de tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) en presencia de luz blanca. b) Niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas salvajes Col-0 y mutantes *fas* luego de 4 h de tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) en oscuridad, luego de 2 h de recuperación bajo luz blanca y de 2 h de recuperación en oscuridad. Las barras representan los valores promedios obtenidos por densitometría (IOD, del inglés Integrated Optical Density) a partir del ADN extraído de seis grupos de hojas de cada genotipo, relativizados al valor promedio obtenido para la línea salvaje Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las plantas que permanecieron en condiciones control no presentaron daño cuantificable en su ADN. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 4.3.** Determinación de los niveles de los transcritos de a) *UVR2* y b) *UVR7* en las hojas #5 de plántulas salvajes Col-0 y mutantes *fas1-4* y *fas2-4* mediante ensayos de RT-qPCR. Las muestras fueron recolectadas en el momento que finalizó el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h, simultáneamente con las muestras de las plantas que permanecieron en condiciones control. Las barras representan el promedio de los niveles de expresión, relativizados al obtenido para la línea salvaje Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error representan el error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



#### 4.3.2. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las hojas de las plantas mutantes *fas1* y *fas2* de manera diferente a nivel celular que a las plantas salvajes Col-0.

Para investigar si la menor acumulación del daño en el ADN en las plantas mutantes *fas1* y *fas2* modificaba el crecimiento de las hojas y producía alteraciones a nivel celular, se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

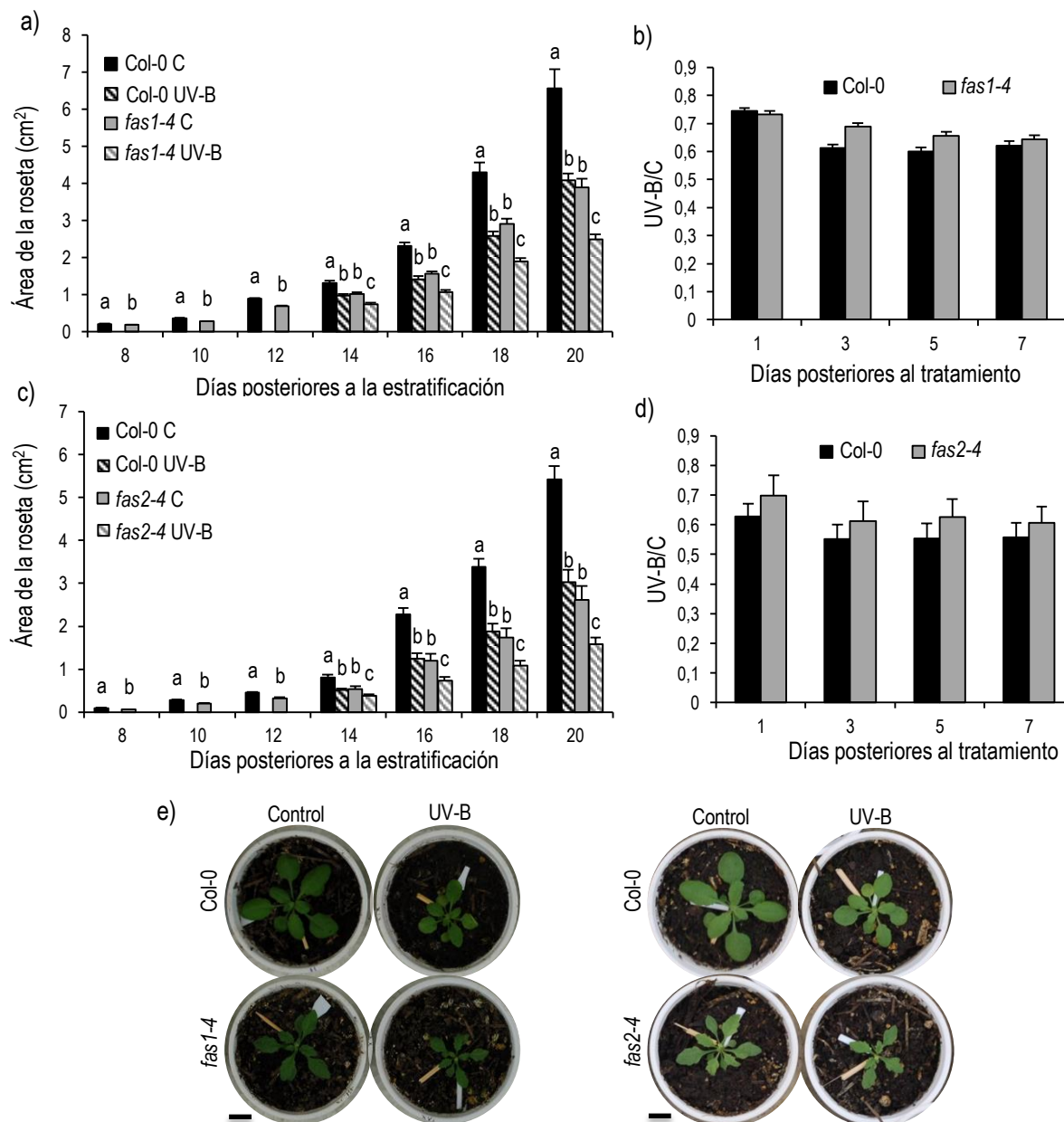
##### 4.3.2.1. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de las hojas.

En primer lugar, se analizó el efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de las hojas de las plantas mutantes *fas* y se comparó con el crecimiento de las hojas de las plantas salvajes Col-0. En ausencia de radiación UV-B, las plantas mutantes presentan rosetas de menor tamaño que las de las plantas salvajes, y si bien luego del tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h las plantas de ambas líneas muestran una marcada disminución en el crecimiento de la roseta, dicha diferencia de tamaño también se mantiene bajo esta condición (Figura 4.4a y c). Este resultado puede interpretarse más claramente al observar los gráficos de las Figura 4.4b y d, en donde se representa la relación entre el área de la roseta de las plantas irradiadas con UV-B con respecto al de las plantas que permanecieron en condiciones control, siendo el promedio similar entre los genotipos en estudio. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que, a pesar de que las plantas mutantes *fas* acumulan menores niveles de DPCs en el ADN que las plantas salvajes Col-0, la radiación UV-B afecta de manera similar el área de la roseta.

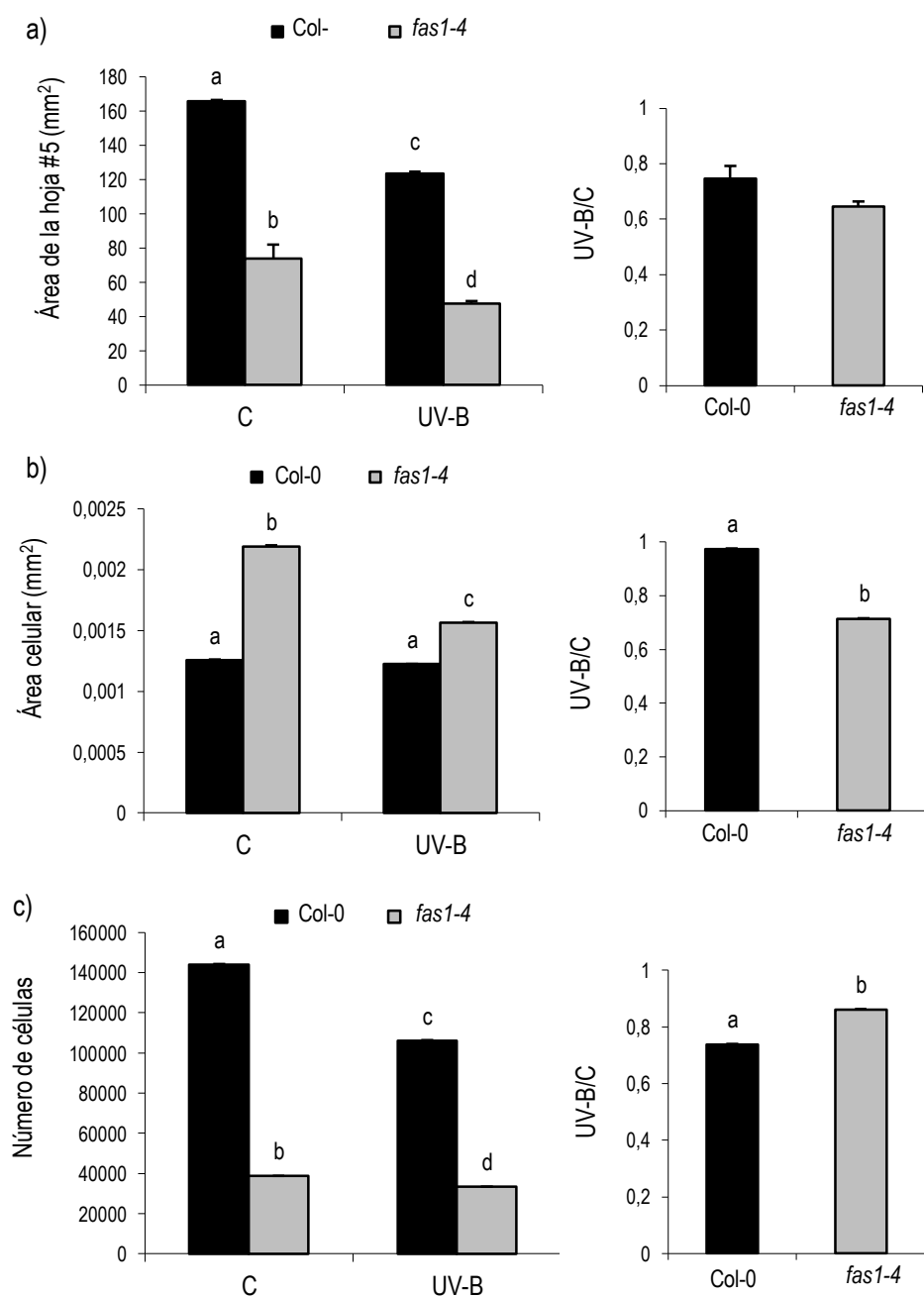
En segundo lugar, y debido a que fue reportado que las hojas de las líneas mutantes *fas* poseen menor cantidad de células pero de mayor tamaño que las de la línea salvaje Col-0 (Exner y col., 2006; Kirik y col., 2006; Ramirez-Parra y Gutierrez, 2007a; Otero y col., 2014), se investigó si la radiación UV-B afecta la proliferación celular y/o la expansión celular en estas líneas. Para ello, se analizaron las hojas #5 completamente desarrolladas, proveniente de plantas que a los 12 días de crecimiento, momento en el que estaba comenzado a formarse dicha hoja, fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o permanecieron en condiciones control. Los resultados obtenidos muestran que, si bien el área de las hojas #5 de las mutantes *fas* es de menor tamaño que la misma hoja de las plantas salvajes Col-0 en las dos condiciones ensayadas, luego del tratamiento con UV-B el crecimiento de las hojas de todas las líneas en estudio se inhibe de manera similar (Figura 4.5a y Figura 4.6a). Sin embargo, a nivel celular, las plantas mutantes *fas1* y *fas2* presentan una menor disminución en el número de células del parénquima en empalizada que las plantas salvajes Col-0 luego de la exposición al UV-B, lo que indica una menor inhibición de la proliferación celular (Figura 4.5c y Figura 4.6c). Este efecto podría ser consecuencia de la menor acumulación de daño en el ADN que presentan las líneas mutantes *fas*.

Con respecto al área de las células del parénquima en empalizada en las hojas #5, esta no varía en las plantas salvajes Col-0 por el tratamiento con UV-B, como fue reportado previamente (Casadevall y

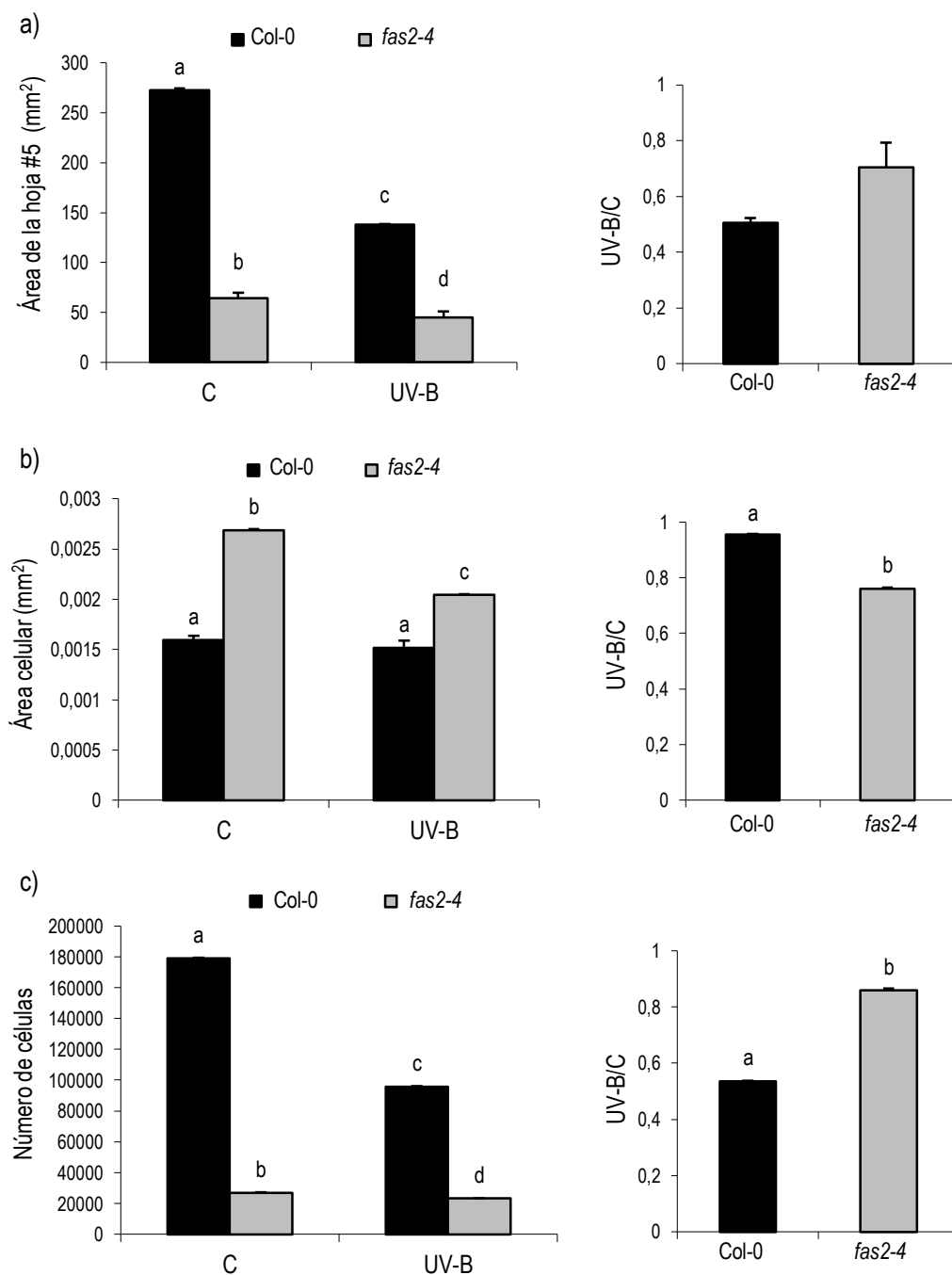
col., 2013). Por el contrario, las plantas mutantes en el complejo CAF-1 muestran una disminución significativa del tamaño celular en aquellas hojas que fueron irradiadas con UV-B (Figura 4.5b y Figura 4.6b). Esto sugiere que podría producirse un efecto de compensación en las plantas mutantes *fas* luego del tratamiento con UV-B.



**Figura 4.4.** a) y c) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas*, expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control. Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas, y las barras de error representan al error estándar. Para cada día, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) y d) Las barras representan el área relativa promedio de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas* en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). e) Fotografías de las plantas salvajes Col-0, mutantes *fas1-4* y mutantes *fas2-4* de 21 días, que fueron tratadas con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento. Las barras de escala representan 1 cm. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



**Figura 4.5.** Análisis de las hojas #5. a) Área de las hojas #5, b) Área de las células del parénquima en empalizada y c) Número promedio de células del parénquima en empalizada de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas1-4* tratadas con radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ; gráficos a la izquierda) o la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ; gráficos a la derecha). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

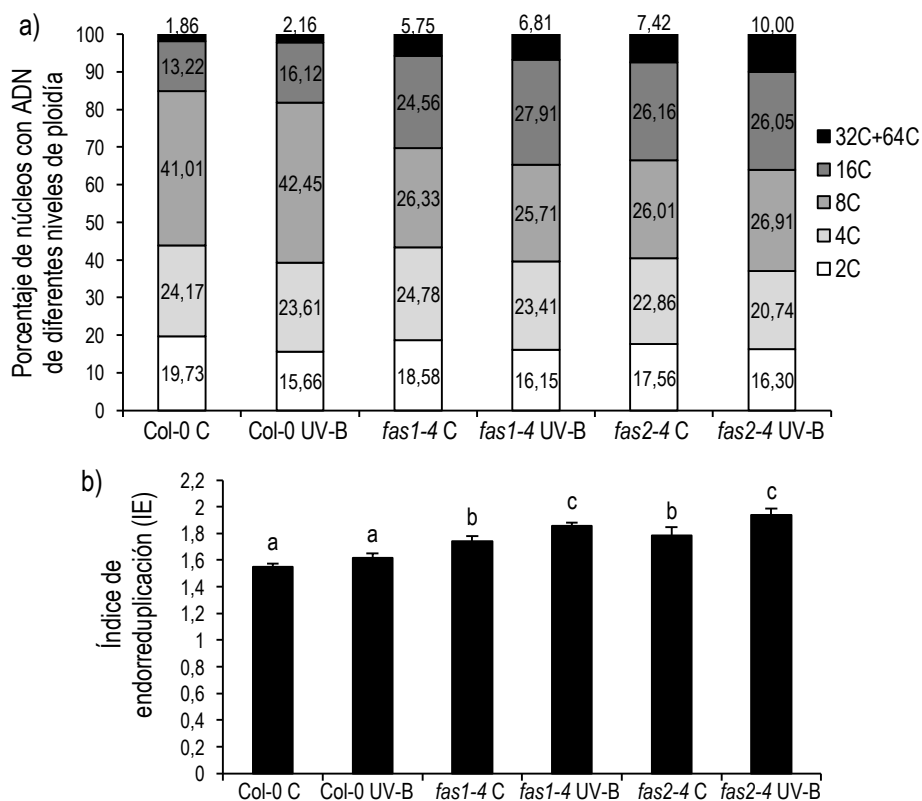


**Figura 4.6.** Análisis de las hojas #5. a) Área de las hojas #5, b) Área de las células del parénquima en empalizada y c) Número promedio de células del parénquima en empalizada de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-4* tratadas con radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ; gráficos a la izquierda) o la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ; gráficos a la derecha). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.2.2. Los niveles de ploidía en las hojas #5 de las plantas *fas1* y *fas2* se modifican por la exposición al UV-B.

Previamente, se demostró que las hojas de las plantas mutantes *fas1* y *fas2* tienen células con mayores niveles de ploidía, lo que se correlaciona, en parte, con el incremento en el área celular (Melaragno y col., 1993; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003; Exner y col., 2006). Con el objetivo de investigar si las diferencias observadas en el área celular en las hojas #5 de estas plantas luego del tratamiento con UV-B se debía a cambios en la ploidía del ADN, se realizaron ensayos de citometría de flujo como se describe en el apartado 2.12 de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos indican que las líneas mutantes *fas1* y *fas2* presentan núcleos con mayores niveles de ploidía en las hojas #5 que la línea salvaje Col-0, con un marcado incremento en el contenido de ADN 16C y 32C+64C, como se reportó previamente (Figura 4.7a; Hisanaga y col., 2013). Además, en condiciones control de crecimiento, las hojas deficientes en el complejo CAF-1 tienen un índice de endorreducción (IE) más alto que el de las hojas salvajes Col-0, lo que se podría correlacionar con el mayor área celular que presentan las mutantes (Figura 4.7b). Sin embargo, luego del tratamiento con UV-B, mientras el IE de las hojas #5 de la línea salvaje Col-0 no se modifica, en las líneas mutantes *fas* el IE aumenta levemente, pero de manera significativa (Figura 4.7b). Por lo tanto, la disminución en el área celular observada en las hojas de las plantas mutantes *fas* luego del tratamiento con UV-B no sería una consecuencia de los cambios en los niveles de ploidía. Por el contrario, el incremento en el índice de endorreducción luego de la exposición al UV-B podría relacionarse con la capacidad de las plantas mutantes *fas* de reparar el ADN más eficientemente, lo que les permitiría reiniciar el endociclo más rápidamente que las plantas salvajes, y así tolerar mejor los efectos causados por la radiación UV-B.



**Figura 4.7.** a) Porcentaje de núcleos que contienen ADN con distintos niveles de ploidía en las hojas #5 completamente desarrolladas de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Índice de endorreduplicación de las hojas #5 de las plantas salvajes y mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, tratadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. Las barras representan el promedio de triplicados biológicos y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.3. La radiación UV-B produce el engrosamiento de la pared celular y cambios en la expresión de las enzimas implicadas en su metabolismo en las plantas mutantes *fas*.

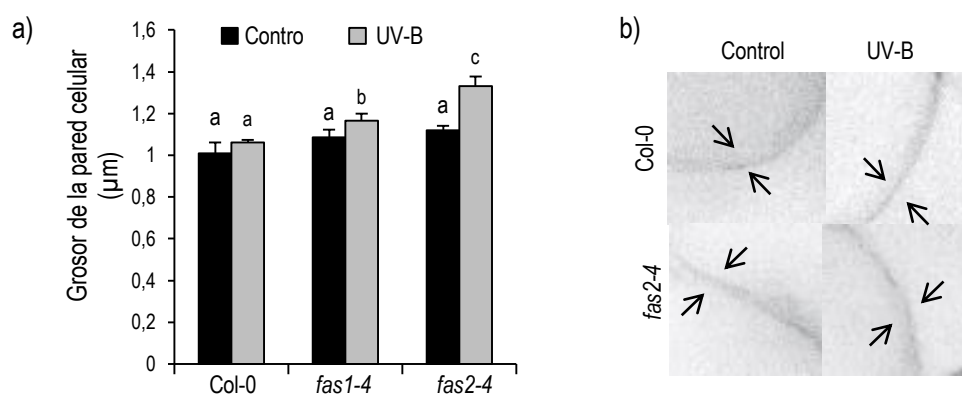
Previamente, Schönrock y colaboradores (2006) analizaron el transcriptoma de las plantas mutantes *fas1* y *fas2*, y determinaron que varios de los transcriptos que codifican para algunas enzimas que participan en el metabolismo de la pared celular se encuentran alterados. Por lo tanto, se procedió a investigar si los cambios producidos por la radiación UV-B en el tamaño celular de las hojas #5 de *fas1* y *fas2* se relacionan con alteraciones en la pared celular.

##### 4.3.3.1. Análisis del grosor de la pared celular.

Para analizar del grosor de la pared celular se utilizaron hojas #5 de plantas salvajes Col-0 y plantas mutantes *fas* que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condiciones control a los días 12 de crecimiento, y que se recolectaron una semana después de la finalización de

los tratamientos. Luego de hacer la tinción con Blanco de Calcofluor, como se detalla en la sección 2.13 de Materiales y Métodos, se determinó el grosor de la pared celular.

Los resultados obtenidos muestran que el grosor de la pared de las células del parénquima en empalizada de las hojas #5 es similar entre las plantas Col-0 que fueron irradiadas con UV-B y las que permanecieron en condiciones control. Sin embargo, en las plantas mutantes *fas* el grosor de la pared de las células en las hojas #5 que fueron mantenidas en condición control es similar al de las plantas Col-0, mientras que en aquellas hojas que fueron irradiadas con UV-B se observó un engrosamiento de la pared de las células del parénquima en empalizada (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** a) Grosor de la pared de las células del parénquima en empalizada en las hojas #5 de plantas salvajes Col-0 y de las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condición control, a los 12 días de crecimiento. Las barras representan el promedio de 100 células y las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA  $p < 0,05$ . b) Fotografías tomadas con un microscopio confocal (Nikon C1), en donde se puede observar parte de la pared de distintas células del parénquima en empalizada (señaladas con flechas), teñidas con Blanco de Calcofluor. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.3.2. Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la pared celular.

A continuación, para analizar si los cambios en el grosor de la pared se debían a cambios en la expresión de genes de este metabolismo en las mutantes *fas*, se analizaron por RT-qPCR los niveles de expresión de los distintos genes de esta vía. Para ello, se extrajo el ARN de las hojas #5 de las distintas líneas en estudio, que fueron tratadas y recolectadas de la misma manera que se describe para la tinción con Blanco de Calcofluor.

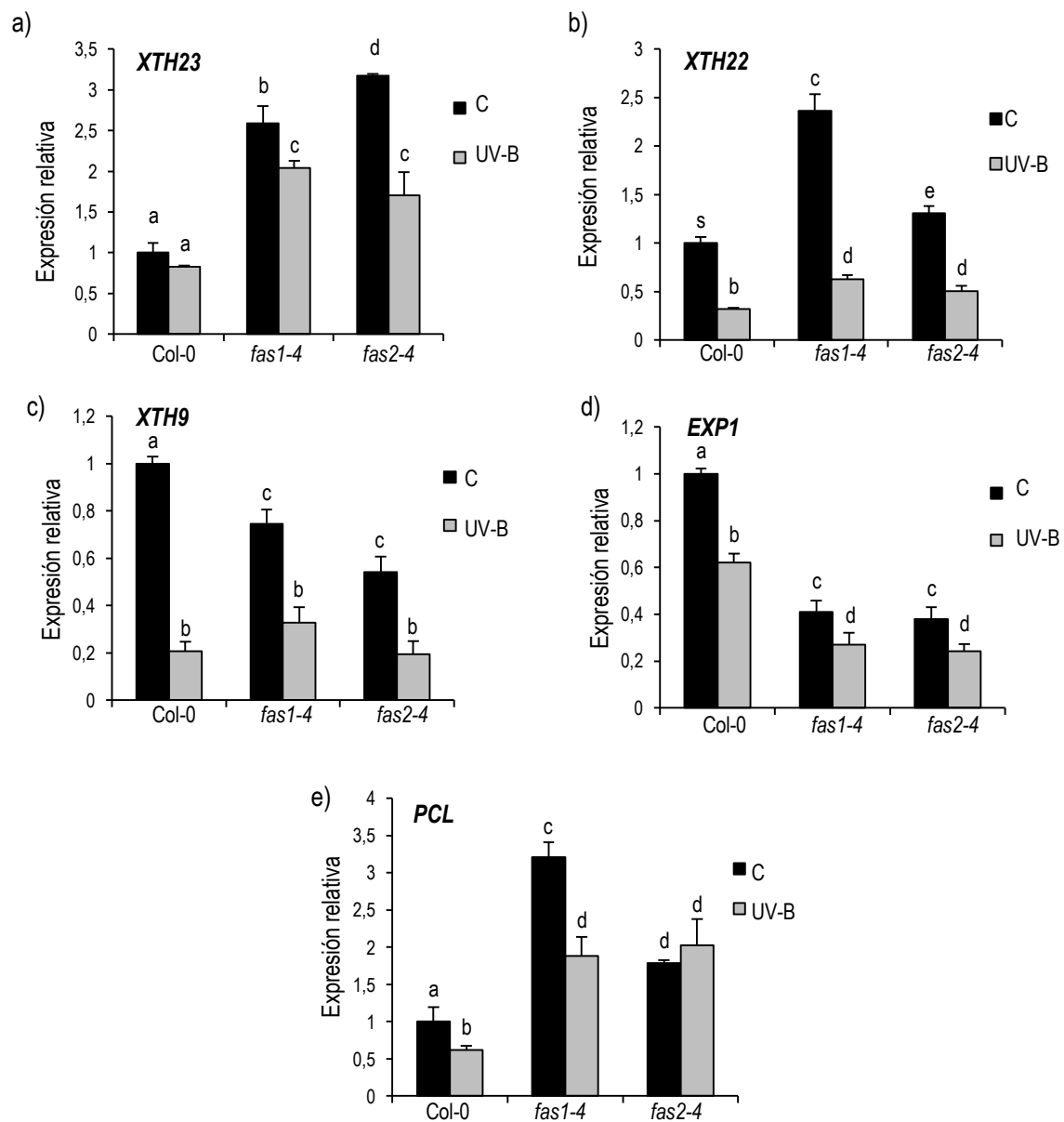
Para poder expandirse, las células vegetales necesitan relajar sus paredes, y las proteínas xiloglucano trans-hidroxilasa (XTH) pueden modificar los entrecruzamientos entre las fibras de celulosa y los xiloglucanos que constituyen la pared celular. Mientras que la ruptura de los enlaces, llevada a cabo por su actividad hidrolítica, resulta en el relajamiento de la pared, las reacciones de transglicosilación pueden fortalecerla (Rose y col., 2002; Sasidharan y col., 2011). En la Figura 4.9a se

muestran los resultados obtenidos para *XTH23*, un gen que codifica para la enzima XILOGLUCANO ENDOTRANSGLUCOSILASA/HIDROLASA 23, en donde se puede observar que los niveles de transcritos se encuentran aumentados en las hojas #5 de las plantas *fas1* y *fas2* en condiciones control de crecimiento y que disminuyen luego del tratamiento con UV-B. Por el contrario, en las hojas #5 de las plantas salvajes Col-0, los niveles de este transcrito son más bajos y no se modificaron por la irradiación con UV-B. Asimismo, la expresión de los genes *XTH22* y *XTH9* también es diferente entre las plantas salvajes y las mutantes (Figura 4.9b y c). Con respecto a *XTH9*, fue reportado que la enzima codificada por este gen participa del remodelado de la pared celular al facilitar el relajamiento de la misma y, posteriormente, permitir la expansión celular (Pholo y col., 2018). En consecuencia, las enzimas XTH tienen el potencial de controlar el crecimiento de la pared celular, por lo que los cambios observados en el tamaño de las células de las hojas #5 expuestas al UV-B en las plantas mutantes *fas1* y *fas2* podrían deberse a la expresión alterada de los transcritos *XTH* y por ende en su actividad.

De manera similar, cambios en la expresión de la enzima expansina *EXP1* se han asociado con el proceso de relajación de la pared celular (Zhang y col., 2011), y se ha demostrado que su expresión disminuye en las plantas de *Arabidopsis* expuestas al UV-B (Hectors y col., 2007). En nuestros experimentos, los niveles del transcrito *EXP1* son significativamente menores en las hojas de las plantas mutantes *fas* que en las hojas de la línea salvaje (Figura 4.9d). Además, el transcrito *PCL*, que codifica para una enzima de la familia de las pectato liasas, se encuentra aumentado en las mutantes *fas* con respecto a las plantas Col-0 (Figura 4.9e).

Por lo tanto, los cambios en la expresión de algunas enzimas del metabolismo de la pared celular en las hojas #5 de las plantas mutantes *fas1* y *fas2* podrían ser al menos una de las razones por las cuales se producen alteraciones en la pared celular y en el tamaño de las células del parénquima en empalizada luego de la irradiación con UV-B.

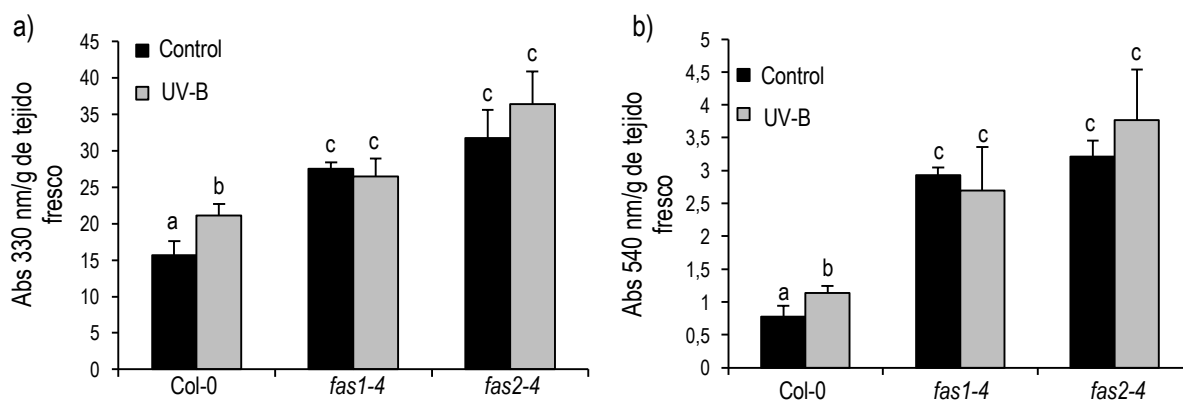




**Figura 4.9.** Análisis de la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en el remodelado de la pared celular mediante experimentos de RT-qPCR. Se determinaron los niveles de los transcritos de los genes a) *XTH23*, b) *XTH22*, c) *XTH9*, d) *EXP1* y e) *PCL*, en las hojas #5 de las plantas salvajes Col-0 y de las plantas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* expuestas a la radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control, y recolectadas una semana después de finalizados los tratamientos. Las barras representan los promedios de expresión obtenidos, relativizados al promedio de expresión en las plantas salvaje Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

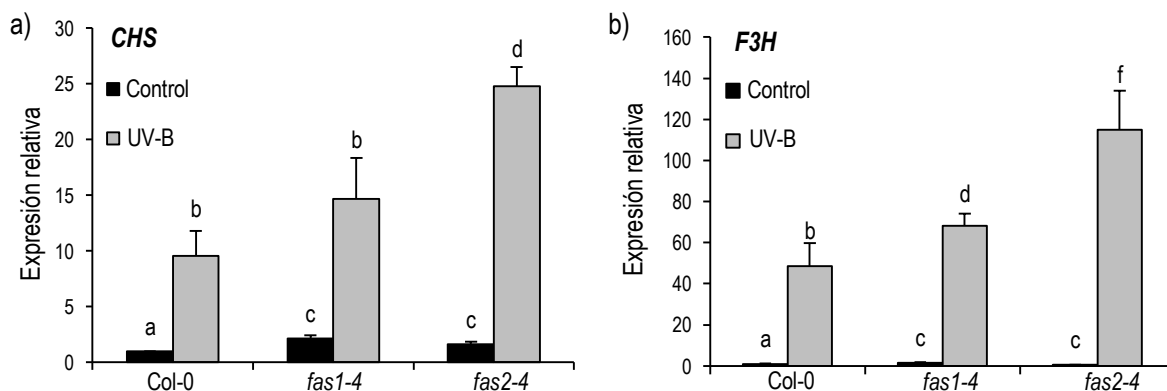
#### 4.3.4. Las plantas mutantes *fas* acumulan mayor cantidad de pigmentos fotoprotectores.

Las plantas mutantes *fas* acumulan menor cantidad de DPCs en su ADN que las plantas salvajes Col-0, lo que puede deberse en parte a que sus células presentan paredes más gruesas, las que podrían actuar como barrera reduciendo el paso del UV-B. Por otra parte, las plantas son capaces de sintetizar otros compuestos que tienen la capacidad de absorber el UV-B, como por ejemplo distintos tipos de compuestos fenólicos, entre ellos, los flavonoides. Por lo tanto, se procedió a analizar los niveles de estos pigmentos fotoprotectores en las hojas de las plantas salvajes Col-0 y de las líneas mutantes *fas*, que fueron irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control. En las Figuras 4.10a y b se muestran los resultados obtenidos, en donde se puede observar que las plantas mutantes *fas* acumulan mayor cantidad de flavonoides totales y antocianinas que las plantas salvajes Col-0, tanto en condiciones control como luego de 4 h de irradiación con UV-B.



**Figura 4.10.** a) Determinación de los niveles de flavonoides totales, expresado como absorbancia a 330 nm por gramo de tejido fresco. b) Determinación del contenido de antocianinas, expresado como absorbancia a 540 nm por gramo de tejido fresco. Las barras representan el promedio de seis medidas obtenidas a partir de grupos de hojas de plántulas de 12 días, de la línea salvaje Col-0 y de las líneas mutantes *fas*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, se analizaron por RT-qPCR los niveles de los transcritos que codifican para las enzimas chalcona sintasa (*CHS*) y flavanona 3-hidroxilasa (*F3H*), las cuales participan en la síntesis de flavonoides. En condiciones control, las hojas de las plantas *fas1-4* y *fas2-4* presentan mayores niveles de estos transcritos que las plantas salvajes Col-0 (Figura 4.11a y b). Luego de la irradiación con UV-B, si bien se induce la expresión de los genes *CHS* y *F3H* en todos los genotipos, las plantas *fas2-4* acumulan mayores niveles de estos transcritos (Figura 4.11a y b). Por lo tanto, las diferencias en la cantidad de metabolitos capaces de absorber la radiación UV-B contribuiría a que las plantas mutantes *fas* acumulen menores niveles de DPCs en el ADN que las plantas salvajes Col-0.



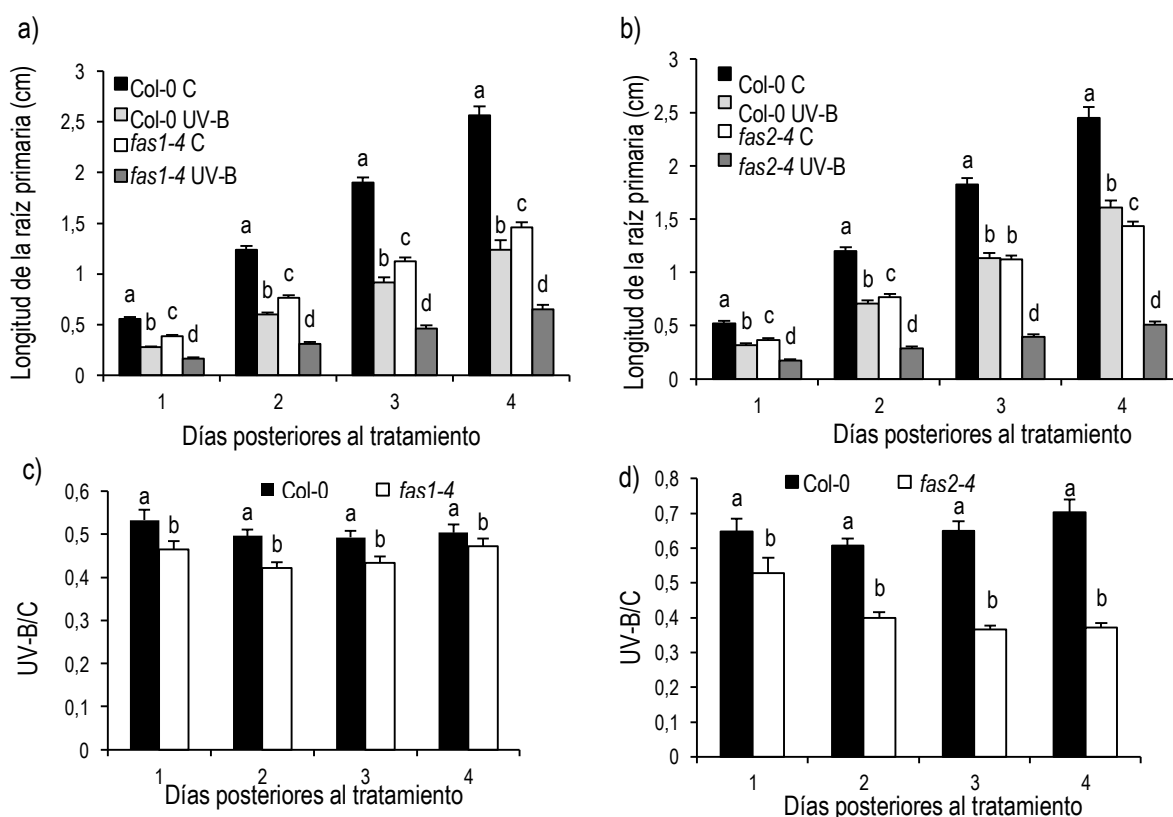
**Figura 4.11.** Análisis de la expresión de los genes a) *CHS* y b) *F3H* mediante ensayos de RT-qPCR. Las barras representan los promedios de expresión obtenidos, relativizados al promedio de expresión en las plantas salvajes Col-0 en condiciones control. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.5. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las raíces en las plantas mutantes *fas*.

Además de inhibir el crecimiento de las hojas, la radiación UV-B también afecta al crecimiento de las raíces (Dotto y Casati, 2017), por lo tanto, se analizó si el complejo CAF-1 participa en el crecimiento de la raíz primaria en plántulas expuestas a la radiación UV-B. Para cumplir con este objetivo, se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

##### 4.3.5.1. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria.

En primer lugar, se analizó el efecto que causa la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria en las plantas salvajes Col-0 y en las plantas mutantes *fas*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.10.1 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que las raíces de las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* son más cortas que las de las plantas salvajes Col-0 en condiciones control de crecimiento (Figura 4.12a y b). Si bien aquellas raíces que fueron irradiadas con UV-B presentan una marcada disminución en su crecimiento, ésta disminución es mayor para las raíces de las líneas mutantes *fas* que para las raíces de la línea salvaje Col-0 (Figura 4.12a y b). Estos resultados pueden comprenderse más claramente al observar las Figuras 4.12c y d, en las que se representa la relación entre la longitud promedio de las raíces que fueron irradiadas con UV-B con respecto al promedio de las raíces que permanecieron en condiciones control, para los 4 días posteriores al tratamiento.



**Figura 4.12.** Análisis de la elongación de la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0 y mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, luego de ser expuestas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. a) y b) Las barras representan la longitud promedio de la raíz primaria de 30 plantas de cada genotipo, en función de los días posteriores a cada uno de los tratamientos. c) y d) Las barras representan la relación entre los promedios de las raíces que recibieron radiación UV-B con respecto a las que permanecieron en condiciones control, en función de los días posteriores a los tratamientos. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA ( $p < 0,05$ ) o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado para cada genotipo, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.5.2. Efecto de la radiación UV-B sobre el meristema radicular.

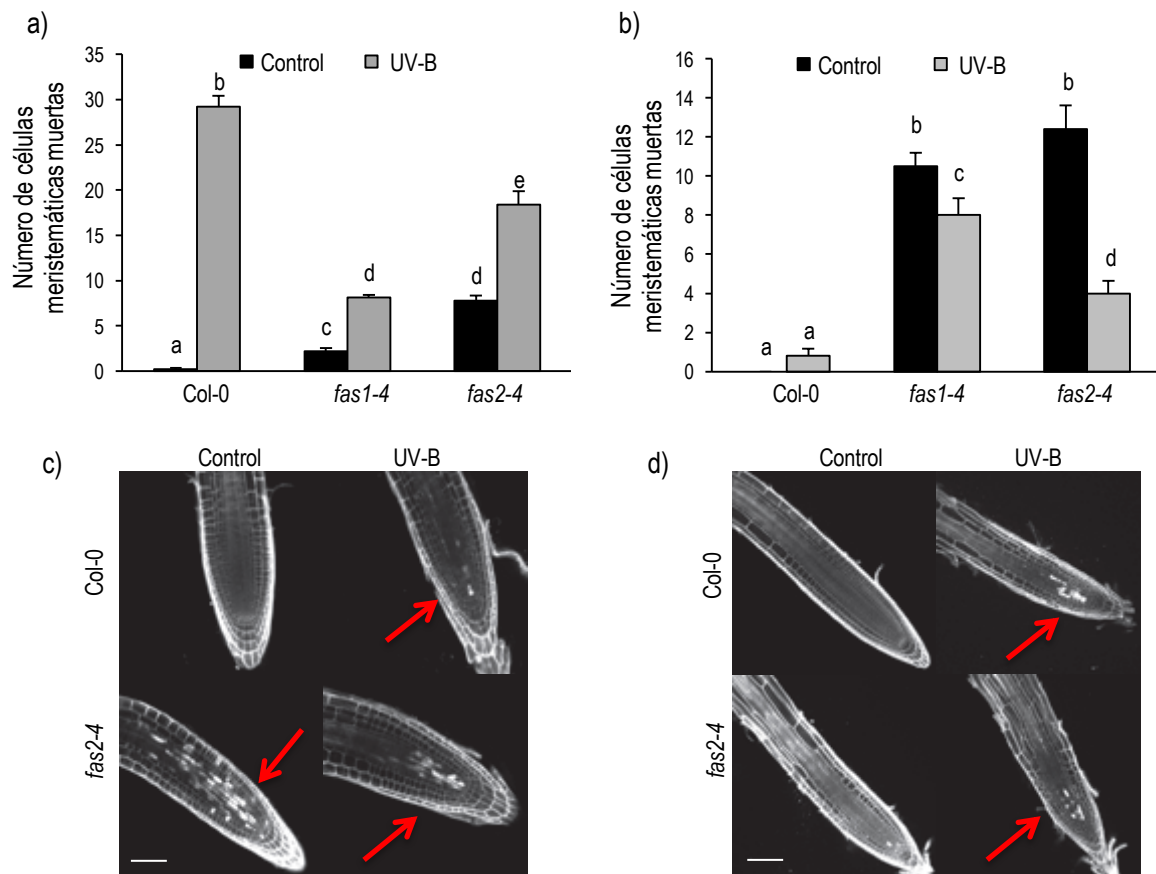
Previamente, Johnson y colaboradores (2018) determinaron que en las raíces, la destrucción programada de las células madre mitóticamente activas que tienen dañado su ADN, desencadena su regeneración permitiendo la recuperación del crecimiento. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar si la inhibición en la elongación de la raíz primaria en las plantas mutantes *fas* se debía a defectos en la inducción de la muerte celular programada (MCP), se registraron las células muertas en el meristema de estas raíces y se las comparó con las de las plantas salvajes Col-0 (Furukawa y col., 2010; González Besteiro y Ulm, 2013; Falcone Ferreyra y col., 2016). En condiciones control de crecimiento en ausencia de UV-B, las raíces de las plantas salvajes no presentan células meristemáticas muertas, mientras que las plantas mutantes *fas1* y *fas2* sí presentan células muertas en el meristema radicular, como había sido reportado anteriormente (Figura 4.13a; Ma y col., 2018). Sin embargo, al día siguiente

de haber realizado el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h, tanto las raíces de las plantas salvajes Col-0 como las raíces de las plantas mutantes *fas* acumulan células muertas, siendo menor la cantidad de estas células en el meristema radicular de las plantas *fas1* y *fas2* (Figura 4.13a), lo que sugiere que el complejo CAF-1 participaría de la MCP luego de la exposición al UV-B. Esta respuesta observada en las raíces mutantes *fas1* y *fas2* es similar a la de las raíces de las plantas mutantes *sog-1*, que muestran menor acumulación de células muertas en su meristema un día después de haber sido tratadas con radiación  $\gamma$  (Johnson y col., 2018). Como se detalla en la Introducción (sección 1.2.2), SOG1 es un factor de transcripción que regula múltiples respuestas a agentes genotóxicos que causan estrés en *A. thaliana*, entre las que se encuentra la MCP (Furukawa y col., 2010).

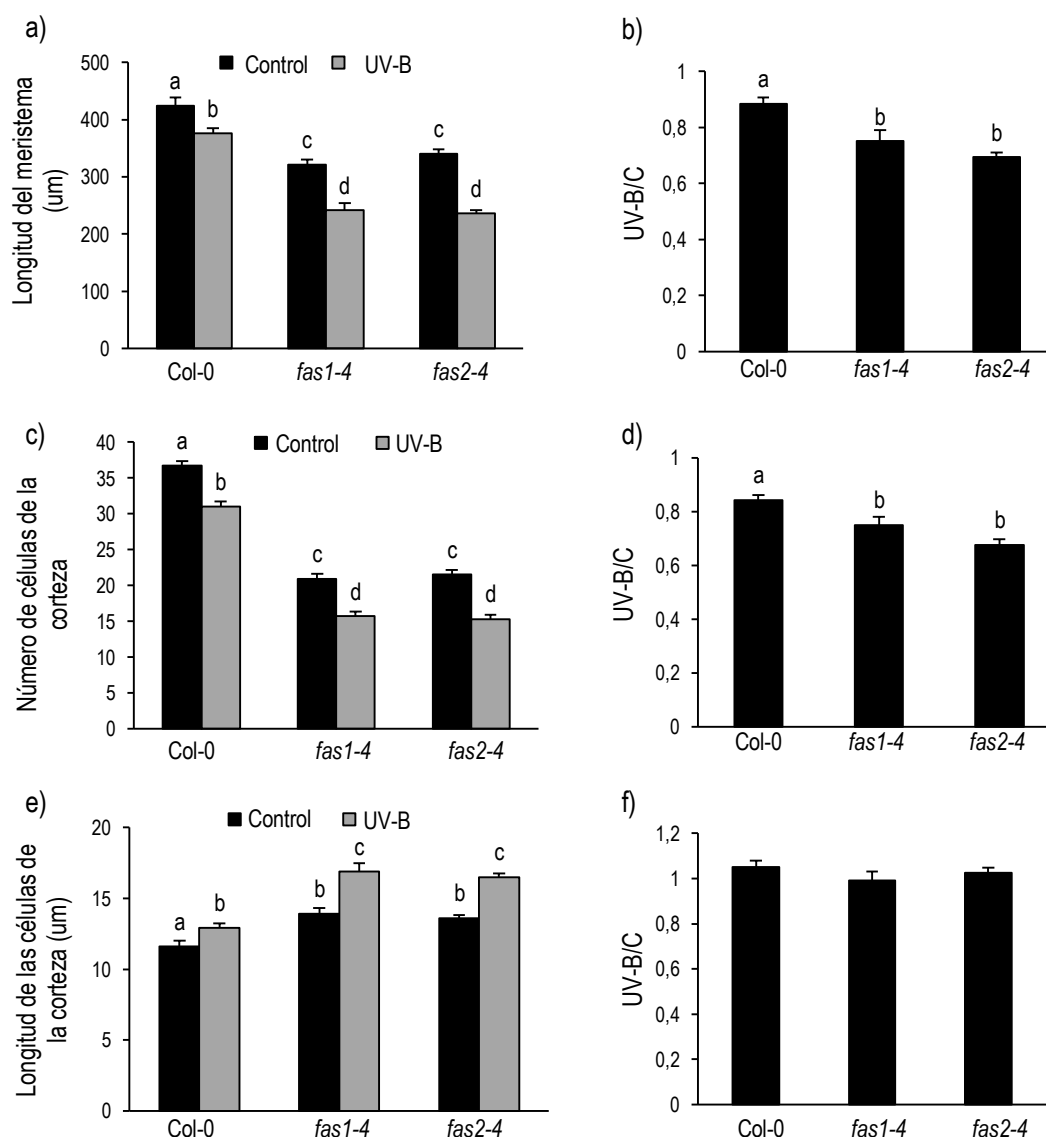
Por otro lado, cuatro días después de haber finalizado el tratamiento con UV-B, mientras que las raíces de las plantas salvajes Col-0 se recuperaron, ya que las células muertas en su meristema son casi indetectables, las raíces de las plantas *fas* aún contienen células meristemáticas muertas (Figura 4.13b). Por lo tanto, las alteraciones en la MCP observadas en las raíces de las plantas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* luego de la exposición al UV-B podrían estar relacionadas con la inhibición en la elongación de la raíz primaria observada en estas líneas luego del tratamiento con UV-B.

A continuación, se procedió a analizar si las alteraciones en la MCP en la zona meristemática de las raíces mutantes *fas* podía afectar el desarrollo del meristema. Para ello, se determinó la longitud del meristema, el número de células de la corteza y la longitud de la mismas en la zona meristemática, en las raíces de plantas mutantes y salvajes a los 4 días de haber sido irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1h o de permanecer en condiciones control. Los resultados obtenidos muestran que la zona meristemática de las raíces *fas1* y *fas2* es más corta que la de las raíces de las plantas salvajes Col-0, y esto ocurre tanto en condiciones control de crecimiento como luego de la exposición al UV-B (Figura 4.14a). Además, la disminución en la longitud del meristema causada por la radiación UV-B es mayor en las raíces de las plantas mutantes que en las salvajes (Figura 4.14a y b), lo cual ocurre como consecuencia de una mayor inhibición de la proliferación celular en las células de la corteza (Figura 4.14c y d). Este resultado es muy interesante debido a que es opuesto a lo observado en las hojas. Además, luego de la exposición al UV-B, la longitud de las células de la corteza aumenta de manera similar en todos los genotipos analizados (Figura 4.14e y f). Por lo tanto, en las raíces de las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, las alteraciones en la MCP luego de la exposición al UV-B podrían afectar al desarrollo del meristema, lo que modificaría el crecimiento y la elongación de estas raíces.

En base a estos resultados y a los obtenidos en las secciones anteriores, podemos concluir que la radiación UV-B afecta de manera opuesta el crecimiento de las hojas y de las raíces de las plantas deficientes en el complejo CAF-1.



**Figura 4.13.** a) y b) Número promedio de células meristemáticas muertas por raíz en la línea salvaje *Col-0* y en las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* al día siguiente (a) o a los cuatro días (b) de haber finalizado el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. Las barras representan el promedio obtenido a partir del análisis de 40 raíces, y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ). c) y d) Fotografías de raíces *Col-0* y *fas2-4* tomadas con un microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) después de un día (c) o de cuatro días (d) de haber finalizado el tratamiento con UV-B o de permanecer en condición control, teñidas con Ioduro de Propidio. Las regiones totalmente coloreadas, indicadas con flechas, corresponden a las células meristemáticas muertas. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.



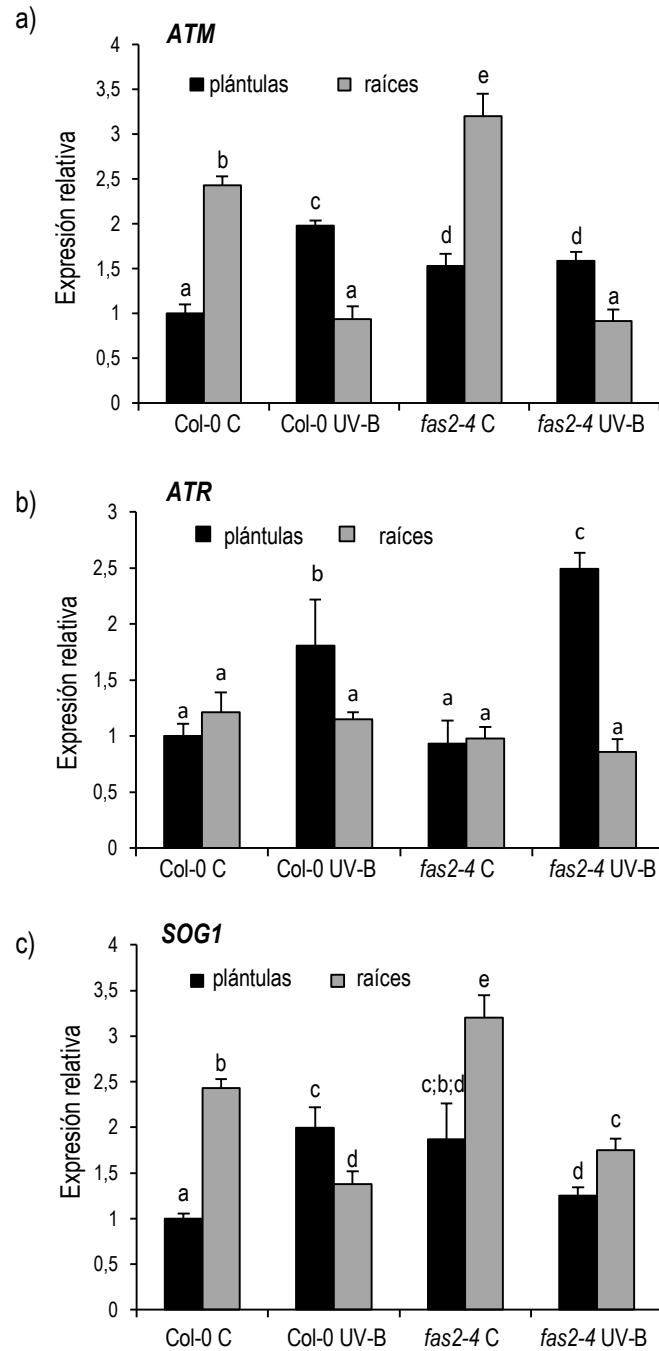
**Figura 4.14.** a) Longitud promedio de la zona meristemática de la raíz, c) número promedio de células de la corteza y e) longitud promedio de las células de la corteza en la zona meristemática de las raíces de plántulas salvajes Col-0 y de plántulas mutantes *fas1-4* y *fas2-4*, cuatro días después de haber sido irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. b), d) y f) Los gráficos representan el promedio de la relación entre los resultados obtenidos en condiciones de irradiación con UV-B, con respecto a los obtenidos en la condición control (C), para la longitud de la zona meristemática (b), el número de células de la corteza (d) y la longitud de las células de la corteza (f), analizados en la línea salvaje Col-0 y en las líneas mutantes *fas1-4* y *fas2-4*. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.3.6. Las plantas mutantes *fas2-4* presentan alteraciones en la expresión de los genes de respuesta al daño en el ADN luego de la exposición a la radiación UV-B.

Con el fin de analizar si las diferencias observadas en las respuestas a la radiación UV-B ocurrían como consecuencia de modificaciones en la expresión de los genes de respuesta al daño en el ADN en los diferentes órganos, se analizaron los niveles de los transcritos *ATM*, *ATR* y *SOG1* en plántulas mutantes *fas2-4* y salvajes Col-0 de 6 días, que permanecieron en condiciones control o que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h y recolectadas inmediatamente luego de la finalización de los tratamientos. Este mismo análisis también se llevó a cabo en las raíces de dichas plántulas.

Los resultados obtenidos muestran que, en las plántulas salvajes Col-0 los niveles del transcrito *ATM* aumentan luego de la exposición al UV-B, mientras que en las plántulas mutantes *fas2-4* no se modifica la expresión de este gen por el tratamiento; sin embargo, la expresión de *ATM* disminuye en las raíces que fueron tratadas con UV-B en los dos genotipos (Figura 4.15a). Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión del gen *SOG1* en plántulas salvajes Col-0 y en plántulas mutantes *fas2-4* (Figura 4.15c). Cabe destacar que en condiciones control en ausencia de UV-B, los niveles de *ATM* y *SOG1* se encuentran elevados tanto en las plántulas como en las raíces de la línea mutante *fas2-4* en comparación con los de la línea salvaje Col-0 (Figuras 4.15a y c). En contraste, los niveles del transcrito *ATR* aumentan luego de la exposición al UV-B en las plántulas salvajes y en las mutantes *fas2-4*, siendo mayor el incremento en la línea mutante que en la línea salvaje, mientras que los niveles de expresión de este gen son similares y no cambian con los tratamientos en las raíces de ambos genotipos (Figura 4.15b). Por lo tanto, es posible que las diferencias en las respuestas al UV-B observadas en los distintos órganos de las plantas mutantes *fas* se deba a las diferencias en los patrones de expresión de los genes de respuesta al daño en el ADN.





**Figura 4.15.** Análisis de los niveles de los transcritos a) *ATM*, b) *ATR*, y c) *SOG1* en plántulas enteras y raíces de la línea salvaje Col-0 y de la línea mutante *fas2-4*, que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condiciones control. Los niveles de los transcritos se analizaron mediante ensayos de RT-qPCR, utilizando para la normalización de los datos el gen *CPK3*. Las barras representan el promedio de los niveles de expresión relativizados al promedio obtenido para la línea salvaje Col-0 en condiciones control. Las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las medidas se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 4.4. DISCUSIÓN

El complejo CAF-1 de *Arabidopsis* está compuesto por las proteínas FASCIATA1 (FAS1), FAS2 y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1). La falta de un complejo funcional en las plantas mutantes *fas1* y *fas2* causa diferentes defectos, tales como hojas y raíces anormales que se producen como consecuencia de alteraciones en los meristemas apical y radicular (Leyser y Furner, 1992; Kaya y col., 2001). También, las plantas mutantes *fas* presentan inhibición de la proliferación celular, aumento de la endoreduplicación (Exner y col., 2006; Ramirez-Parra y Gutierrez, 2007a) y desregulación de la expresión de determinados genes (Schönrock y col., 2006; Mozgova y col., 2015). Además, estas plantas mutantes muestran acortamiento en sus telómeros, pérdida de ADN<sub>r</sub> 45S y un incremento en las frecuencias de recombinación homóloga y meiótica (Endo y col., 2006; Kirik y col., 2006; Mozgova y col., 2010; Muchova y col., 2015; Varas y col., 2015). Estos defectos en el genoma ocasionan rupturas doble hebra en el ADN, lo que conlleva a la activación de las “Respuestas del Daño en el ADN” (DDR) a través de la proteína quinasa ATM, la cual reconoce principalmente cortes doble hebra (Culligan y col., 2006; Yoshiyama y col., 2014). Sin embargo, los efectos producidos por agentes que causan defectos en la replicación, como son los DPCs, no habían sido estudiados hasta el momento.

Mediante diversos experimentos realizados durante este trabajo de Tesis, se demostró que las plantas deficientes en el complejo CAF-1 presentan diferente sensibilidad a la radiación UV-B cuando se analizan las hojas y las raíces. En las hojas, las plantas mutantes *fas1* y *fas2* acumulan menores niveles de DPCs que las plantas salvajes Col-0 luego de la exposición al UV-B, tanto cuando los tratamientos se realizaron en presencia de luz como en oscuridad, así como también luego de un periodo de recuperación de 2 h. Si bien estos resultados parecen contradecir a los reportados previamente, en dichos estudios se analizaron las rupturas doble hebra en el ADN y los procesos que intervienen en su reparación (Endo y col., 2006; Kirik y col., 2006; Mozgova y col., 2010; Muchova y col., 2015; Varas y col., 2015), mientras que la radiación UV-B en elevadas dosis produce principalmente alteraciones en la replicación al inducir la formación de DPCs y 6-4 PP<sub>s</sub> en el ADN (Friedberg y col., 1995). Como se describe en la Introducción (sección 1.2.2), los diferentes tipos de daño en el ADN pueden activar la vía DDR a través de las proteínas quinasas ATM o ATR, y la exposición a la radiación UV-B puede inducir la activación de esta respuesta a través de ambas quinasas (Furukawa y col., 2010). Previamente, Hisanaga y colaboradores (2013) sugirieron que la activación de la vía DDR y el inicio del endociclo, lo cual causa que las hojas de las plantas mutantes *fas1* presenten menor cantidad de células con niveles de ploidía más elevados, eran dependientes sólo de la actividad de ATM. En los experimentos que se presentan en este capítulo se determinó que, mientras que los niveles de los transcritos de *ATM* y *SOG1* aumentan significativamente luego de la exposición al UV-B en las plántulas salvajes Col-0, en las plántulas mutantes *fas2-4* no se modifican por los tratamientos, aunque en ausencia de UV-B los niveles de estos transcritos se encuentran elevados en la línea mutante. Por otra parte, los niveles del transcrito *ATR* aumentan en las dos líneas

luego de la exposición al UV-B, siendo mayor el incremento en la línea *fas2-4* que en la línea salvaje Col-0. Por lo tanto, las diferentes respuestas observadas en las hojas de las plantas deficientes en el complejo CAF-1 podría deberse al tipo de daño en el ADN generado por los diferentes tratamientos, lo que llevaría a la activación y regulación de la vía DDR de manera diferencial.

Por otro lado, los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la pared de las células del parénquima en empalizada se engrosa en las hojas de las plantas mutantes *fas1* y *fas2* luego de la exposición al UV-B, a la vez que se modifica la expresión de genes que codifican para las enzimas que participan en el remodelado de la misma. Además, las hojas de las plantas mutantes *fas* acumulan mayores niveles de pigmentos fotoprotectores, como son los flavonoides y las antocianinas, que las plantas salvajes Col-0. Por lo tanto, los cambios en las propiedades de la pared celular y el incremento en el contenido de compuestos fenólicos contribuirían a una mayor absorción de la radiación UV-B. Estas propiedades, junto con la disposición de una cromatina más laxa y accesible para los sistemas de reparación, contribuirían a que las plantas mutantes *fas* acumulen menores niveles de daño en su ADN luego de la exposición al UV-B, aunque no se observen diferencias en la expresión de las enzimas encargadas de reparar específicamente los DPCs.

Con respecto a lo descrito anteriormente, también se observó que la menor acumulación del daño en el ADN en las plantas mutantes *fas* se relaciona con una menor inhibición de la proliferación celular. De esta manera, la capacidad de reparar más rápidamente el ADN dañado conlleva a que las células reinicien la proliferación celular también más rápido. Lo que resulta interesante es el hecho de que las plantas mutantes *fas* también muestran un incremento en los niveles de ploidía en las hojas #5 que fueron irradiadas con UV-B, mientras que dicho cambio no se observó en las hojas #5 de las plantas salvajes Col-0. Estudios realizados previamente sugieren que aquellas plantas que poseen la capacidad de reparar el ADN más eficientemente, como por ejemplo aquellas deficientes en la expresión del factor de transcripción *E2Fe*, reasumen el endociclo más rápidamente que las plantas salvajes, lo que contribuye a su mayor tolerancia a la radiación UV-B (Radziejewski y col., 2011). Se ha propuesto que la endoreduplicación sería una alternativa que las plantas utilizarían para protegerse de la radiación UV-B, debido a que la presencia de múltiples copias del genoma podría reducir el riesgo de perder genes esenciales por mutaciones, o que estas podrían participar de la reparación por recombinación homóloga al usar la copia sin mutaciones como molde (Kondorosi y Kondorosi, 2004). Otra hipótesis es que el endociclo permitiría el crecimiento de los tejidos por expansión celular bajo condiciones que inhiben la proliferación celular (Barow y Meister, 2003). En los experimentos que se realizaron en este trabajo de Tesis se determinó que el incremento en la endoreduplicación observado en las hojas #5 de las plantas mutantes *fas* luego de la irradiación con UV-B no está acompañado por un aumento en el tamaño celular, sino que por el contrario, se produce una disminución del mismo, lo cual podría estar relacionado con el incremento del grosor de la pared celular bajo esta condición. Corneillie y colaboradores (2019) demostraron que plantas de *Arabidopsis* con diferentes niveles de

ploidía en sus células somáticas presentan diferencias en la composición de la pared celular. Al realizar una caracterización de las mismas, determinaron que existe una correlación negativa entre el nivel de ploidía y el contenido de lignina y celulosa, mientras que existe una correlación positiva entre el nivel de ploidía y el contenido de hemicelulosa y pectina en los tallos. Por lo tanto, bajo condiciones de irradiación con UV-B, el aumento en el grosor de la pared de las células que constituyen las hojas en crecimiento de las plantas mutantes *fas1* y *fas2* podría ser una consecuencia del incremento en los niveles de ploidía del ADN.

Por otra parte, al analizar las raíces de las plántulas mutantes *fas1* y *fas2*, se observó que en condiciones normales de crecimiento las mismas son más cortas que las raíces de las plántulas salvajes Col-0, en concordancia con lo que había sido reportado previamente (Ma y col., 2018). El complejo CAF-1, junto con las chaperonas de histonas NAP1-RELATED PROTEIN 1 (NRP1) y NRP2 de tipo H2A/H2B, participan en el mantenimiento del nicho de células madre en el meristema radicular de las plantas de *Arabidopsis*, por lo que las mutantes *fas2-4* presentan raíces principales más cortas, a la vez que poseen reducida la longitud de la zona meristemática y contienen menor cantidad de células en dicha zona (Ma y col., 2018). Los resultados descriptos en este capítulo muestran que las raíces de las plántulas mutantes *fas* presentan mayor inhibición del crecimiento de la raíz primaria que las raíces de las plantas salvajes Col-0 luego de la irradiación con UV-B, lo que podría ser consecuencia de que la zona meristemática de las raíces mutantes es más corta que la de las raíces salvajes luego del tratamiento. Esto se relacionaría con una mayor inhibición de la proliferación celular de las células de la corteza en las raíces de las plantas mutantes *fas* con respecto a las raíces de plantas salvajes Col-0, ya que la longitud de estas células aumenta de manera similar en todos los genotipos después de la exposición al UV-B. Estos resultados son llamativos, ya que son opuestos a los descriptos para las hojas, en donde ocurre una menor inhibición de la proliferación celular y una disminución en el área celular en las líneas mutantes *fas*, después del tratamiento con UV-B. Sin embargo, estas diferencias pueden deberse a que el complejo CAF-1 participa de la regulación de la expresión de diversos genes que regulan el crecimiento del meristema radicular (Ma y col., 2018). Además, Ma y colaboradores (2018) reportaron que, en condiciones normales de crecimiento, las raíces de las plantas *fas2-4* muestran células muertas y elevados niveles de histonas H2AX fosforiladas, una marca que indica daño en el ADN, sugiriendo que las plantas mutantes en el complejo CAF-1 se encuentran constantemente bajo situaciones de estrés genotóxico. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos al irradiar las plántulas mutantes *fas* con UV-B. Si bien un día después del tratamiento con UV-B las raíces de las plantas mutantes *fas1-4* y *fas2-4* muestran menor cantidad de células meristemáticas muertas que las raíces de las plantas salvajes Col-0, al cuarto día posterior al tratamiento, se observa que las células muertas en las raíces de las plantas salvajes son casi imperceptibles, mientras que las raíces de las plantas mutantes *fas* contienen una gran cantidad de células muertas en su meristema, tanto aquellas que permanecieron en condiciones control como las

que fueron irradiadas con UV-B. Así, el mayor número de células meristemáticas muertas en las raíces de las plántulas mutantes *fas* podría causar una disminución en el tamaño del meristema, tanto en ausencia como en presencia de la radiación UV-B. Además, se observó que los niveles de los transcritos *ATM* y *SOG1* se encuentran elevados en las raíces de las plantas mutantes *fas2-4* en condiciones control de crecimiento, por lo tanto, las alteraciones observadas en el programa de muerte celular podrían ser una consecuencia de cambios en la expresión de los genes de respuesta al daño en el ADN. Es importante mencionar que las plantas deficientes en CAF-1 y NRP1/2 presentan aumentada la expresión de genes implicados en los puntos de control del daño al ADN, como *SMR5*, que codifica para una proteína perteneciente a la familia de inhibidores de CDKs, *WEE1*, que codifica para una proteína quinasa que inhibe el ingreso a la mitosis, *SOG1*, *PARP1*, *PARP2* y *BRCA1*, que fueron descritos previamente (Ma y col., 2018). Por lo tanto, los resultados obtenidos junto con los reportados en la bibliografía sugieren que CAF-1, junto con NRP1 y NRP2, mantienen la integridad del genoma, lo cual es importante para el correcto funcionamiento del meristema durante el desarrollo de las raíces.

## Capítulo 5

### Conclusiones



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de este trabajo de Tesis son las siguientes:

- ✓ **Los factores de transcripción E2Fb y E2Fc regulan el crecimiento de las plantas expuestas a la radiación UV-B a través de mecanismos diferentes.**

Mediante diferentes experimentos demostramos que, cuando las plantas de *Arabidopsis* son irradiadas con UV-B a una intensidad de  $2 \text{ W m}^{-2}$ , se produce la inhibición de la proliferación celular en las hojas en crecimiento, la cual es regulada por los factores de transcripción E2Fb y E2Fc. Por un lado, E2Fb regularía el crecimiento de las hojas, en parte, a través de E2Fe, debido a que algunos de los resultados obtenidos son coincidentes con los reportados por Radziejewski y colaboradores (2011), entre los que se encuentran la menor inhibición del crecimiento de las hojas y el aumento en los niveles de ploidía en el ADN luego de la exposición al UV-B. Por otro lado, a partir del análisis del meristema radicular, se concluye que E2Fb no participaría del programa de muerte celular que se activa cuando las células meristemáticas no pueden reparar su ADN.

En lo que respecta a E2Fc, determinamos que actúa epistáticamente sobre el miR396, el cual forma parte de una vía que controla el crecimiento de las hojas expuestas a la radiación UV-B (Casadaveall y col., 2013). Sin embargo, la respuesta mediada por E2Fc sería independiente de los factores de transcripción de la familia GRF y no involucraría la regulación del miR396 llevada a cabo por los TCPs de clase II, sino que se debería a alteraciones en la expresión de diferentes genes del ciclo celular. Además, E2Fc regula, directa o indirecta, la expresión de los genes *ATR* y *SOG1*, por lo que participaría de las respuestas al daño en el ADN, como es la muerte celular programada llevada a cabo en las células del meristema radicular luego de la exposición al UV-B, y no específicamente en la reparación del daño causado en el ADN por esta radiación.

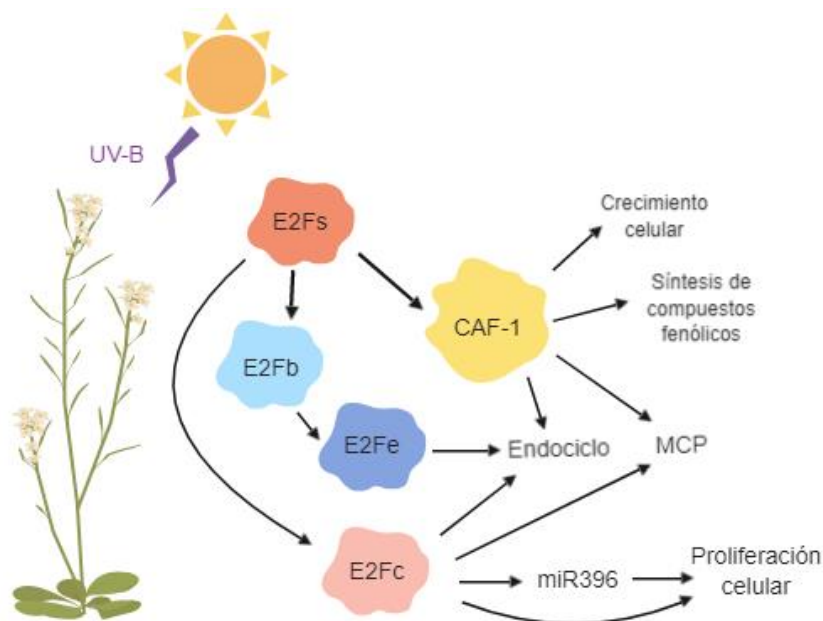
Finalmente, evidenciamos que las respuestas al UV-B mediadas por E2Fb y E2Fc son independientes del fotorreceptor UVR8 y de la proteína quinasa MPK3.

- ✓ **El complejo CAF-1 participa de las respuestas al daño en el ADN producidas por la radiación UV-B.**

Mediante la caracterización de líneas mutantes de *Arabidopsis* con deficiencia en la actividad del complejo CAF-1, se determinó que las hojas y las raíces de estas plantas responden de manera diferencial a la radiación UV-B. Por un lado, las hojas toleran mejor la radiación UV-B que las hojas de las plantas salvajes, debido a que sus células presentan menor inhibición de la proliferación celular. A pesar de que estas células muestran a su vez disminución en el área celular, contienen núcleos con

mayores de niveles de ploidía, lo que podría deberse a que acumulan menor cantidad de daño en su ADN, lo que les permitiría reanudar el proceso de endoreduplicación más rápidamente. En relación a esto, también se determinó que las hojas de las plantas mutantes *fas* presentan paredes celulares engrosadas y mayor cantidad de pigmentos fotoprotectores, lo que les ayudaría a absorber parte de la radiación UV-B que reciben.

Por otro lado, las raíces de las plantas deficientes en la actividad del complejo CAF-1 muestran una mayor inhibición de su crecimiento luego de ser irradiadas con UV-B que las raíces de la línea salvaje. Esto podría deberse a que presentan una mayor disminución en el tamaño de la zona meristemática como consecuencia de una mayor inhibición de la proliferación celular en las células de la corteza, aunque el largo de las mismas aumenta en respuesta a la radiación UV-B. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por Ma y colaboradores (2018), que demostraron que existen diferencias en el desarrollo de las hojas y las raíces de plantas mutantes *fas2*. Por lo tanto, las células del meristema apical y radicular no sólo tendrían diferentes mecanismos de protección frente al daño en el ADN, sino que además activarían de manera diferencial las respuestas a este tipo de daño, como se evidenció al cuantificar por ensayos de RT-qPCR los niveles de los transcritos de *ATM*, *ATR* y *SOG1*. Esto podría relacionarse con que el complejo CAF-1 cumpliría distintas funciones en diferentes órganos de las plantas de *Arabidopsis*.



**Figura 5.1.** Modelo que ilustra la relación entre los factores de transcripción E2Fs y/o el complejo CAF-1 con las diferentes vías involucradas en las respuestas a la radiación UV-B.



## Capítulo 6

### Anexo



## 6. ANEXO

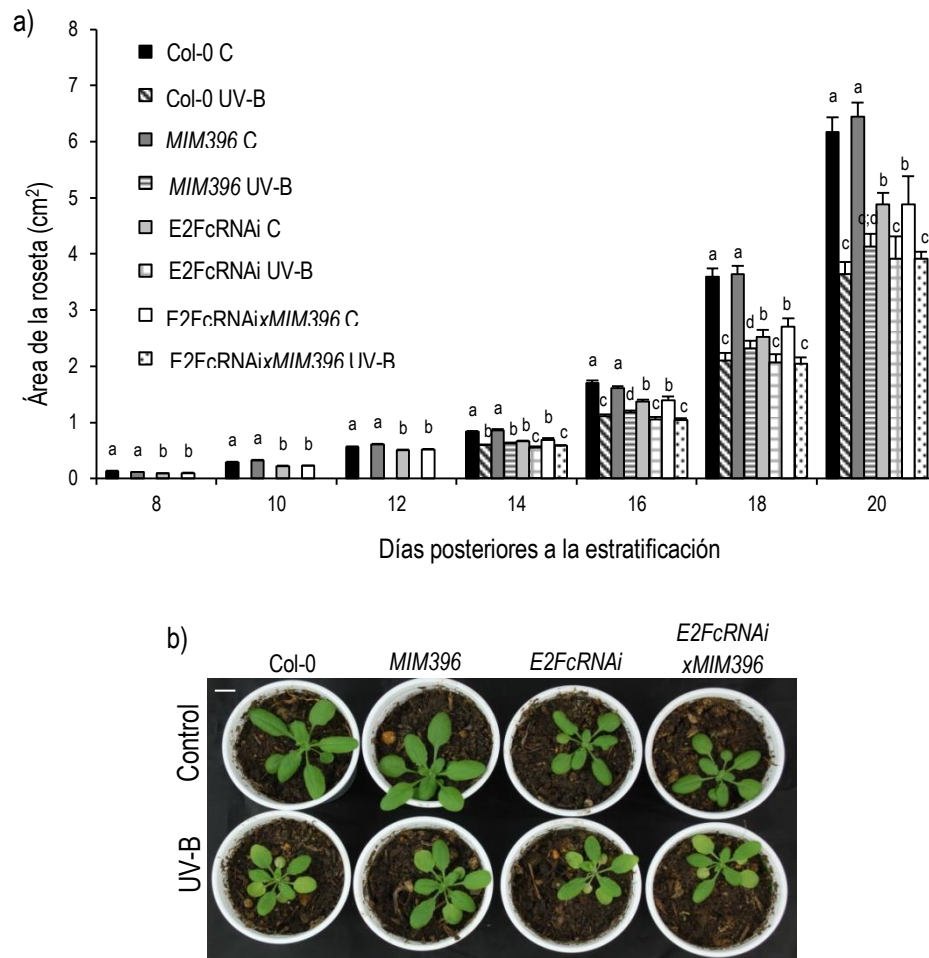
Los resultados obtenidos con la línea transgénica *E2FcRNAixMIM396* y con las líneas mutantes *e2fb-1* y *fas2-3* se presentan a continuación.

### 6.1. Resultados obtenidos con la línea transgénica *E2FcRNAixMIM396*.

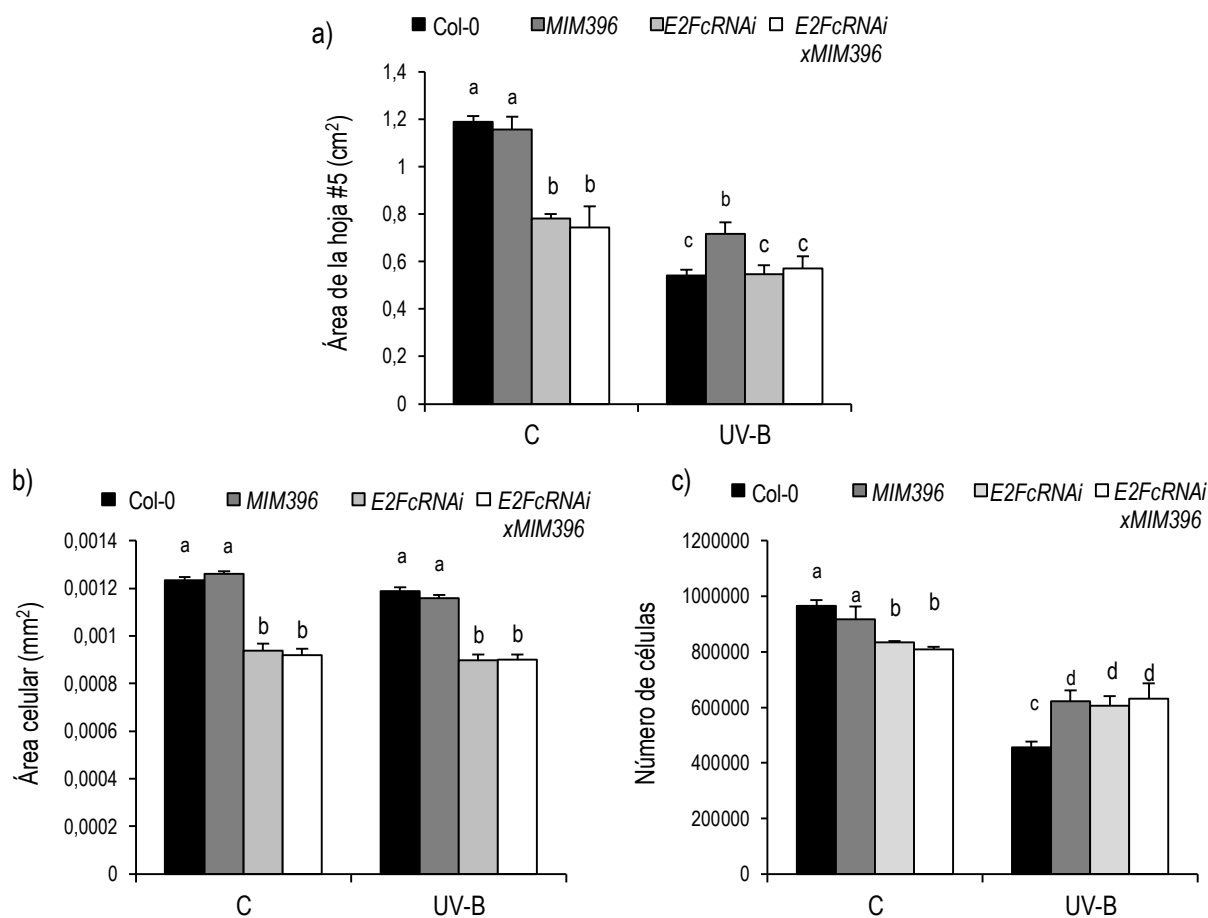
#### 6.1.1. Las plantas de la línea *E2FcRNAixMIM396* presentan una menor inhibición del crecimiento de las hojas luego de la exposición al UV-B debido a que presentan una menor inhibición de la proliferación celular.

Al cuantificar el área de la roseta de las plantas transgénicas *E2FcRNAixMIM396*, se determinó que en condiciones control de crecimiento, las mismas presentan un área promedio similar a la de su parental *E2FcRNAi*, es decir que son de menor tamaño que las plantas de la línea transgénica *MIM396* y que las plantas de la línea salvaje Col-0 (Figura 6.1). Por otro lado, las plantas que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h muestran inhibido su crecimiento de manera similar a sus parentales *E2FcRNAi* y *MIM396*, es decir, su crecimiento se afectó menos por el tratamiento que las plantas salvajes Col-0, aunque fenotípicamente las plantas *E2FcRNAixMIM396* se asemejan a las plantas *E2FcRNAi* también bajo esta condición (Figura 6.1).

A continuación, para investigar si la menor inhibición del crecimiento de las hojas luego del tratamiento con UV-B se debía cambios en el área celular y/o en la proliferación celular, se analizaron a nivel microscópico las hojas #5 totalmente expandidas. Se determinó que el área de las células del parénquima en empalizada y el número de células presentes en las hojas #5 de las plantas *E2FcRNAixMIM396*, así como también el área de dicha hoja son similares a las de las plantas *E2FcRNAi*, tanto en condiciones control de crecimiento como luego de la exposición al UV-B (Figura 6.2).



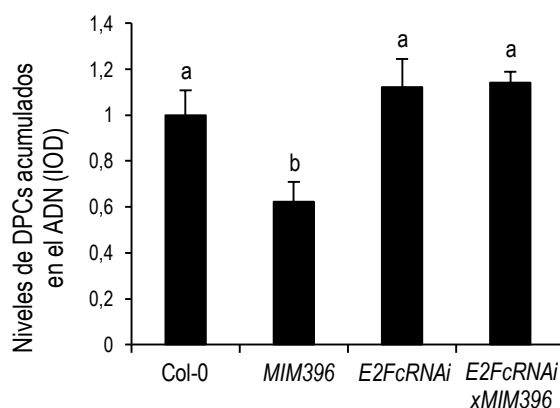
**Figura 6.1.** a) Análisis del área de la roseta de plantas salvajes Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396* en condiciones control y luego de irradiar las plantas con UV-B. Los tratamientos fueron realizados a los 12 días de crecimiento, que es el momento de desarrollo en el que están comenzando a formarse las hojas #5. Las barras representan el promedio de 10 plantas y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) Imagen representativa de las plantas de los distintos genotipos a las 2 semanas de haber realizado el tratamiento con radiación UV-B o en condiciones control. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares



**Figura 6.2.** Análisis de las hojas #5 de plantas salvajes Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396* irradiadas con UV-B o que permanecieron en condiciones control. En las mismas se cuantificó: a) el área de las hojas #5, b) el área de las células y c) el número de células del parénquima en empalizada. Las barras representan el promedio de 10 hojas y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 6.1.2. Las plantas de la línea *E2FcRNAi*x*MIM396* acumulan niveles de DPCs similares a los de las plantas transgénicas *E2FcRNAi*.

A continuación, se cuantificaron los niveles de DPCs acumulados en el ADN en las hojas de plantas de 12 días que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que fueron mantenidas en condiciones control. En la Figura 6.3 se muestran los valores promedio de DPCs acumulados en el ADN de las líneas salvaje Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396* luego de ser irradiadas con UV-B, ya que en las plantas que permanecieron en condiciones control no se detectó daño cuantificable. Las plantas *E2FcRNAi*x*MIM396* presentan niveles de DPCs similares a los de las líneas *E2FcRNAi* y Col-0, mientras que sólo las plantas *MIM396* acumulan menor cantidad de daño en el ADN.

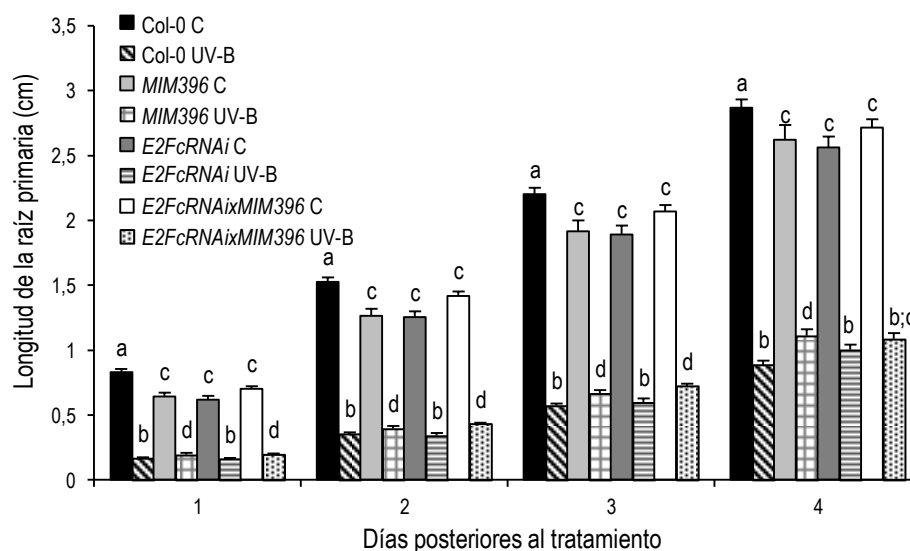


**Figura 6.3.** Cuantificación por densitometría de los niveles de DPCs acumulados en el ADN en hojas de plantas de 12 días de las líneas salvaje Col-0, *MIM396*, *E2FcRNAi* y *E2FcRNAi*x*MIM396*, luego de ser irradiadas con UV-B. Las barras representan el promedio de 6 grupos de plántulas de cada una de las líneas analizadas, relativizados al promedio obtenido en las plantas salvajes Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

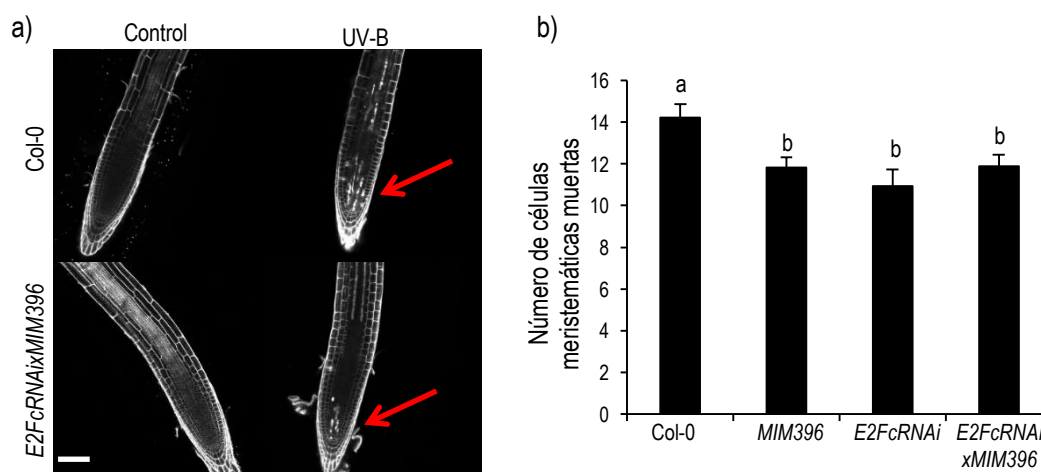
#### 6.1.3. La radiación UV-B afecta el crecimiento de la raíz primaria de las plantas *E2FcRNAi*x*MIM396* de manera similar a como lo hace en las raíces de las líneas parentales.

Al analizar la raíz primaria de las plantas *E2FcRNAi*x*MIM396*, se determinó que en condiciones control de crecimiento presenta una longitud similar a la de las líneas transgénicas *E2FcRNAi* y *MIM396*, es decir, es más corta que la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0; mientras que luego de realizado el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h, presenta un fenotipo de menor inhibición del crecimiento, también similar al de sus parentales (Figura 6.4).

A continuación, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el meristema radicular, para lo cual se determinó el número de células meristemáticas muertas. En ausencia de UV-B, no se observaron células muertas en el meristema de las raíces *E2FcRNAi*x*MIM396*, mientras que luego de la exposición al UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h, el número de células muertas es menor al registrado en las plantas salvajes Col-0, y similar al determinado en la línea *MIM396*x*E2FcRNAi* y en las líneas parentales (Figura 6.5).



**Figura 6.4.** Análisis de la elongación de la raíz primaria en función de los días posteriores al tratamiento con UV-B y al tratamiento control. Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas salvajes y de plantas doble transgénicas *E2FcRNAi x MIM396*, junto al de sus parentales *MIM396* y *E2FcRNAi*, en condiciones control o de exposición al UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h. Las barras representan el promedio de 30 raíces y las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas para cada día analizado, al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

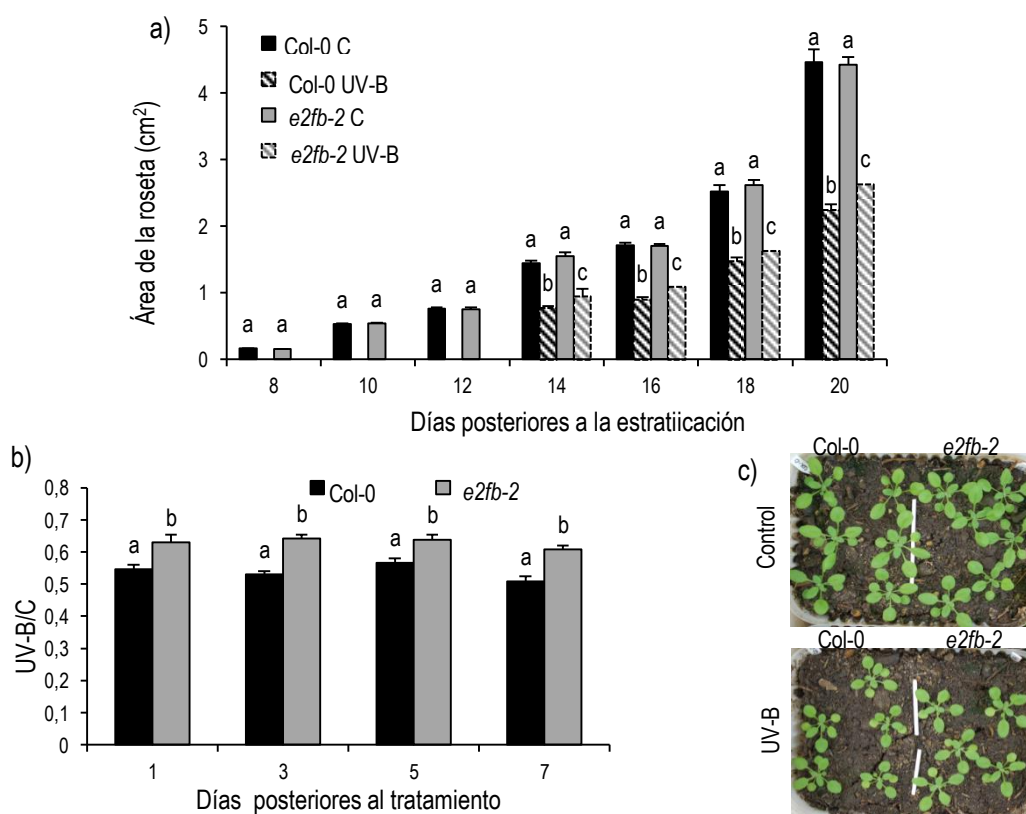


**Figura 6.5.** Cuantificación del número de células muertas en el meristema radicular, luego de exponer plántulas de 5 días a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 1 h. a) Imágenes tomadas en el microscopio confocal láser de barrido (Nikon C1) luego de teñir las raíces con Ioduro de Propidio. Las flechas indican las células muertas y la barra de escala representa  $100 \mu\text{m}$ . b) El gráfico representa el número de células meristemáticas muertas luego de 24 h de haber finalizado el tratamiento con UV-B. Las barras representan el promedio de 40 raíces y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

## 6.2. Resultados obtenidos con la línea mutante *e2fb-2*.

### 6.2.1. Las plantas mutantes *e2fb-2* presentan menor inhibición del crecimiento de las hojas luego de la exposición al UV-B.

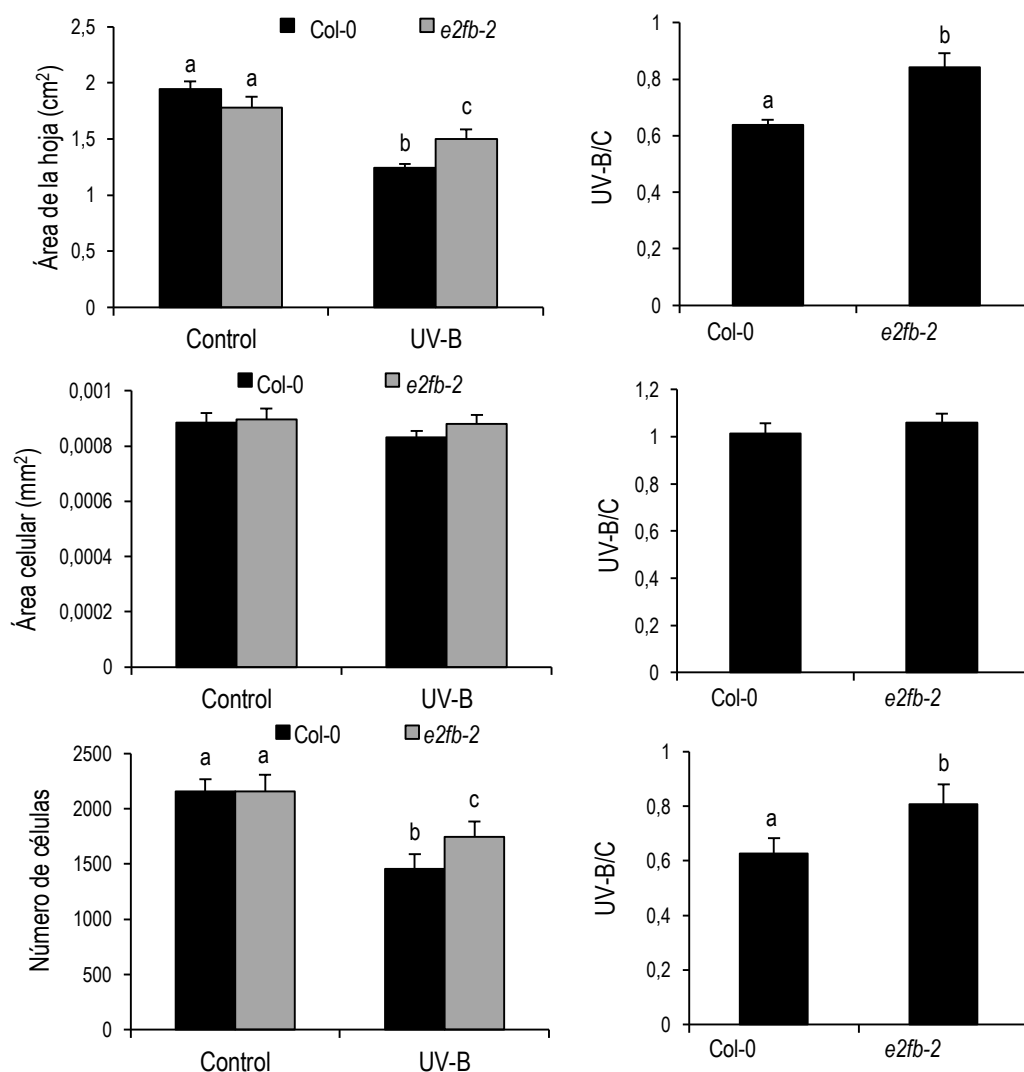
Al analizar el área de la roseta de plantas mutantes *e2fb-2* se determinó que en condiciones control de crecimiento, el área promedio de la roseta es similar al área promedio obtenido para las plantas salvajes Col-0. Si bien luego de que se realizó el tratamiento con UV-B se observó una marcada inhibición del crecimiento, el área de la roseta de las plantas mutantes *e2fb-2* es mayor que el área de las plantas salvajes (Figura 6.6).



**Figura 6.6.** a) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes y mutantes *e2fb-2* expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control. Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas y la barra de error representa el error estándar. b) Relación entre el promedio del área de plantas irradiadas con UV-B y el promedio de las plantas mantenidas en condiciones control para cada uno de los genotipos, en función de los días posteriores a los tratamientos. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas estadísticas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografías de plantas salvajes y *e2fb-2* de 18 días que fueron tratadas con radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o mantenidas en condiciones control, a los 12 días de crecimiento. La barra de escala representa 1 cm. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

A continuación, con el objetivo de determinar si la menor inhibición del crecimiento de las plantas *e2fb-2* luego de la exposición al UV-B se debía a cambios en la proliferación celular y/o en la expansión celular, se analizaron las hojas #5 totalmente expandidas. Los resultados obtenidos muestran que, en

condiciones control, no hay diferencias en el área de las hojas #5, en el área de las células del parénquima en empalizada ni en el número de células, entre las plantas salvajes y las mutantes (Figura 6.7). Sin embargo, en aquellas plantas que fueron irradiadas con UV-B, se observó que hay una marcada disminución en el área de las hojas #5, siendo la misma significativamente menor en las plantas *e2fb-2* que en las plantas salvajes, lo cual es coincidente con lo observado en el área de la roseta. A nivel microscópico, se determinó que las hojas #5 de las plantas mutantes presentan una menor disminución en el número de células que las plantas salvajes Col-0, lo que se asocia con una menor inhibición de la proliferación celular, mientras que el área celular no se modifica por los tratamientos en ninguno de los dos genotipos (Figura 6.7).

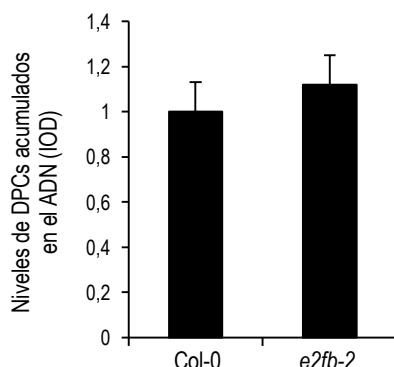


**Figura 6.7.** Análisis de las hojas #5. a) Área de las hojas #5, b) área de las células del parénquima en empalizada y c) número promedio de células del parénquima en empalizada de plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-2* irradiadas con UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.



### 6.2.2. Determinación de la acumulación del daño en el ADN en las plantas *e2fb-2*.

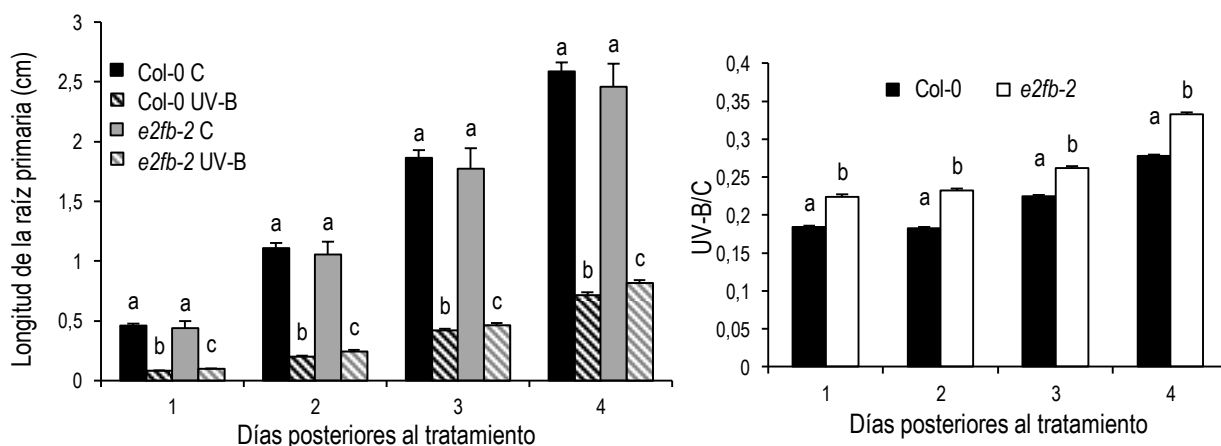
Mediante la realización de ensayos de dot blot, utilizando anticuerpos anti-DPCs, se determinó que las hojas de las plantas *e2fb-2* acumulan niveles similares de daño en el ADN que las plantas salvajes Col-0 (Figura 6.8).



**Figura 6.8.** Cuantificación del daño acumulado en el ADN luego de la exposición al UV-B en las hojas de plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-2* mediante ensayos de dot blot. En el gráfico se representan los niveles promedio de DPCs acumulados en el ADN, relativizados al promedio obtenido en las plantas salvajes, a partir de seis grupos de plantas de 12 días de cada genotipo. Las barras de error corresponden al error estándar. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). Las plantas sometidas al tratamiento control no presentan daño cuantificable en el ADN. El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 6.2.3. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria de las plantas *e2fb-2*.

Al analizar la raíz primaria de las plantas *e2fb-2*, no se observaron diferencias significativas entre el largo de la raíz primaria de las plantas mutantes y las salvajes en condiciones control, mientras que luego del tratamiento con UV-B, las plantas mutantes muestran una menor inhibición del crecimiento de la raíz primaria que las plantas salvajes. (Figura 6.9).

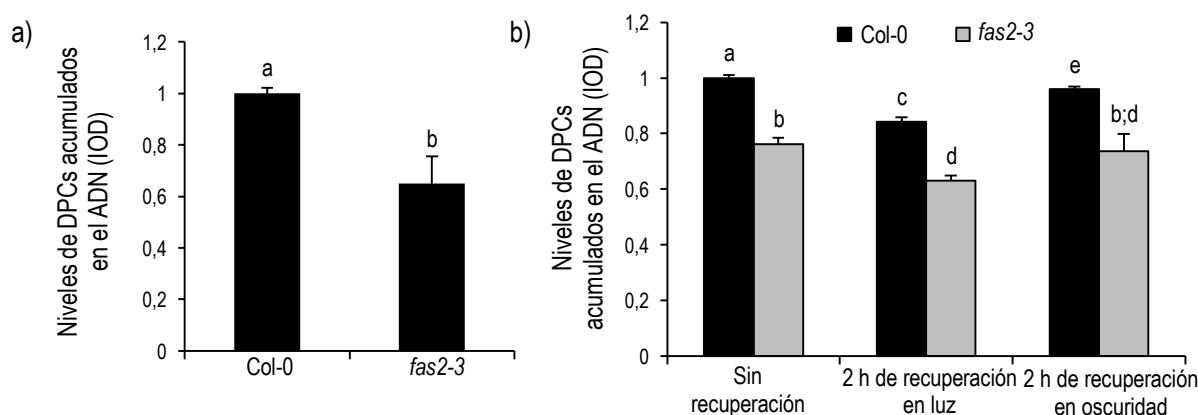


**Figura 6.9.** a) Longitud de la raíz primaria en función de los días posteriores al tratamiento control o con radiaciones UV-B en plantas salvajes Col-0 y mutantes *e2fb-2*. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en 30 raíces. b) Las barras representan el promedio de la relación entre la longitud de la raíz primaria de las plantas tratadas con UV-B con respecto a las de plantas tratadas en condiciones control, en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 6.3. Resultados obtenidos con la línea mutante *fas2-3*.

#### 6.3.1. Las plantas *fas2-3* acumulan menor cantidad de daño en el ADN luego de la exposición al UV-B.

Con el fin de analizar los niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas de plantas salvajes Col-0 y de plantas mutantes *fas2-3*, se realizaron ensayos de dot blot utilizando anticuerpos anti-DPCs. Los resultados obtenidos muestran que las plantas mutantes acumulan menores niveles de DPCs en su ADN que las plantas salvajes Col-0 luego recibir radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h en presencia de luz blanca (Figura 6.10a). En esta condición las enzimas fotoliasas son capaces de reparar los dímeros de pirimidina. Estas diferencias se mantienen cuando las plantas son tratadas con UV-B en oscuridad, y también cuando, una vez finalizado este tratamiento, las plantas se recuperan durante 2 h en presencia de luz blanca o en oscuridad (Figura 6.10b).

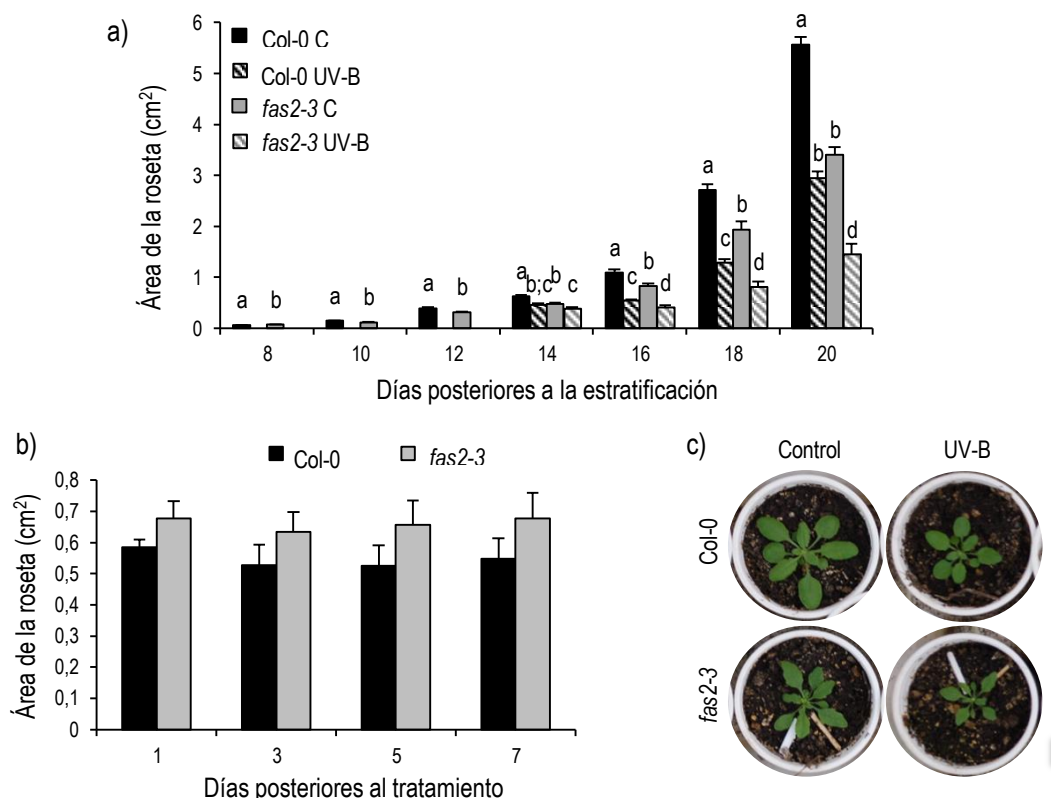


**Figura 6.10.** Determinación del daño en el ADN causado por la radiación UV-B en plantas salvajes Col-0 y en plantas mutantes *fas2-3*, mediante ensayos de dot blot. a) Niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3* luego de 4 h de tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) en presencia de luz blanca. b) Niveles de DPCs acumulados en el ADN de hojas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3* luego de 4 h de tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) en oscuridad, luego de 2 h de recuperación bajo luz blanca y de 2 h de recuperación en oscuridad. Las barras representan los valores promedios obtenidos por densitometría (IOD, del inglés Integrated Optical Density) para cada genotipo, relativizados al valor promedio obtenido para la línea salvaje Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar y las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). Las plantas que permanecieron en condiciones control no presentaron daño cuantificable en su ADN. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 6.3.2. La radiación UV-B afecta el crecimiento de las hojas a nivel celular de manera diferente en las plantas mutantes *fas2-3* que en las plantas salvajes Col-0.

En primer lugar, se analizó el efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de las hojas de las plantas mutantes *fas2-3*. En condiciones control de crecimiento, las plantas mutantes presentan rosetas de menor tamaño que las plantas salvajes (Figura 6.11a). Luego del tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h, se observó que se produce inhibición del crecimiento de la roseta de manera similar en las

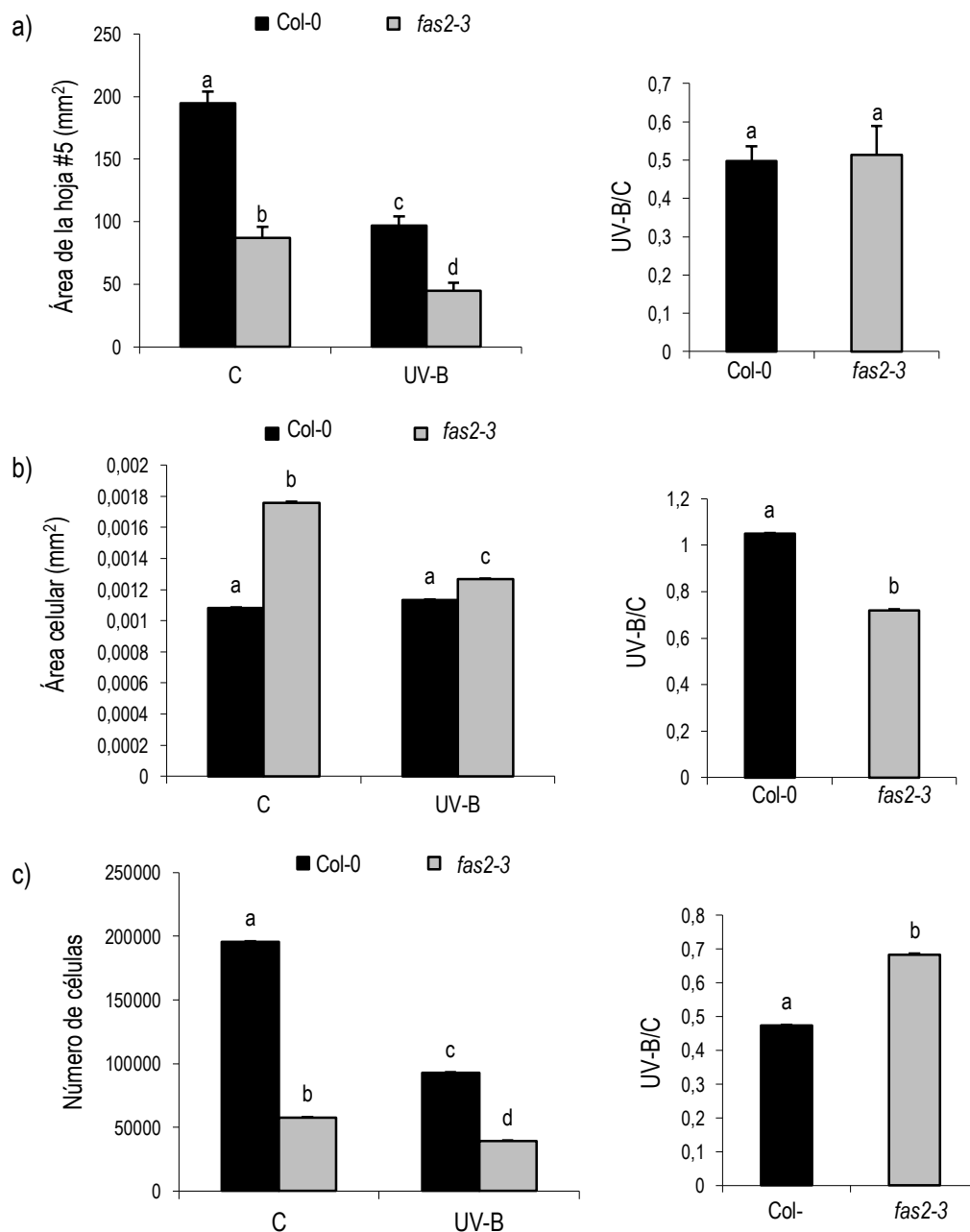
plantas de ambas líneas, a la vez que la diferencia de tamaño también se mantiene bajo esta condición (Figura 6.11 a y b).



**Figura 6.11.** a) Área de la roseta en función de los días posteriores a la estratificación de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3*, expuestas a la radiación UV-B o mantenidas en condiciones control. Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas, y las barras de error representan al error estándar. Para cada día, las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). b) Las barras representan el área relativa promedio de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3* en función de los días posteriores al tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). c) Fotografías de las plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3* de 21 días, que fueron tratadas con radiación UV-B (2 W m<sup>-2</sup>) por 4 h o mantenidas en condiciones control a los 12 días de crecimiento. La barra de escala representa 1 cm. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

En segundo lugar, se investigó si la radiación UV-B afecta la proliferación celular y/o la expansión celular en las hojas *fas2-3*. Para ello, se analizaron las hojas #5 completamente desarrolladas, proveniente de plantas que a los 12 días de crecimiento, momento en el que estaba comenzado a formarse dicha hoja, fueron irradiadas con UV-B (2 W m<sup>-2</sup>) por 4 h o permanecieron en condiciones control. Los resultados obtenidos muestran que, si bien el área de las hojas #5 de las plantas *fas2-3* es de menor tamaño que la misma hoja de las plantas salvajes Col-0 en las dos condiciones ensayadas, luego del tratamiento con UV-B el crecimiento de las hojas de todas las líneas en estudio se inhibe de manera similar (Figura 6.12a). Sin embargo, a nivel celular, las plantas mutantes *fas2-3* presentan una menor disminución en el número de células del parénquima en empalizada que las plantas salvajes Col-0 luego de la exposición al UV-B, lo que indica una menor inhibición de la proliferación celular

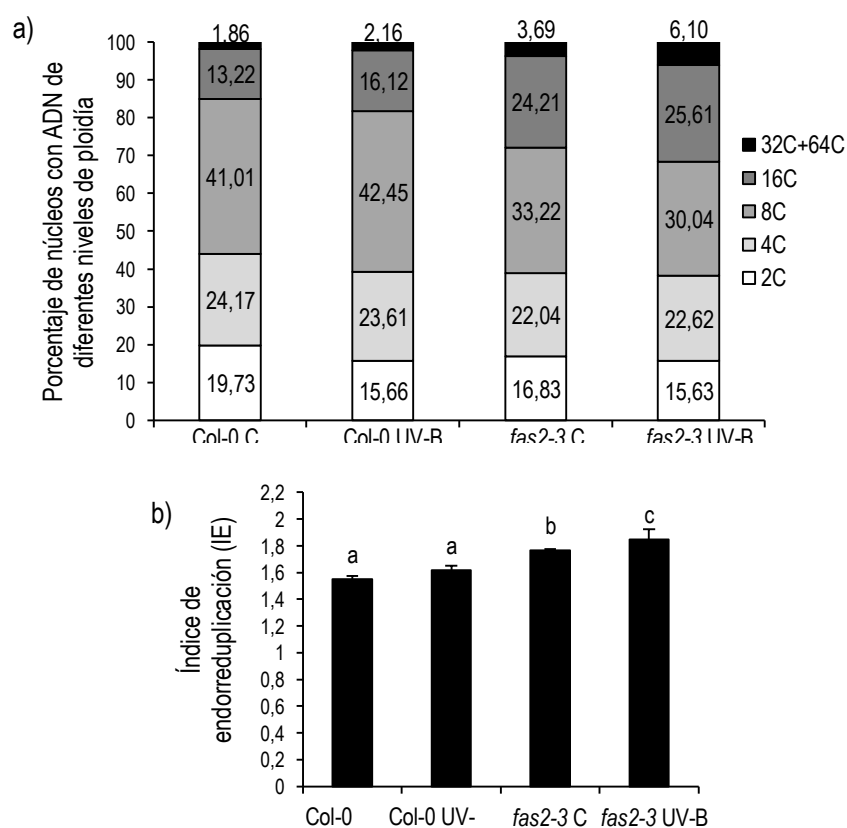
(Figura 6.12c). Con respecto al área de las células del parénquima en empalizada en las hojas #5, esta no varía en las plantas salvajes Col-0 por el tratamiento con UV-B. Por el contrario, las plantas mutantes *fas2-3* muestran una disminución significativa del tamaño celular en aquellas hojas que fueron irradiadas con UV-B (Figura 6.12b).



**Figura 6.12.** Análisis de las hojas #5. a) Área de las hojas #5, b) Área de las células del parénquima en empalizada y c) Número promedio de células del parénquima en empalizada de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3* tratadas con radiación UV-B por 4 h o mantenidas en condiciones control. En el panel de la izquierda, las barras representan el promedio de 10 hojas, mientras que, en el panel de la derecha, las barras representan la relación UV-B/C de dichos valores. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ; gráficos a la izquierda) o la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ; gráficos a la derecha). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

### 6.3.3. La radiación UV-B produce alteraciones en los niveles de ploidía del ADN en las hojas de las plantas mutantes *fas2-3*.

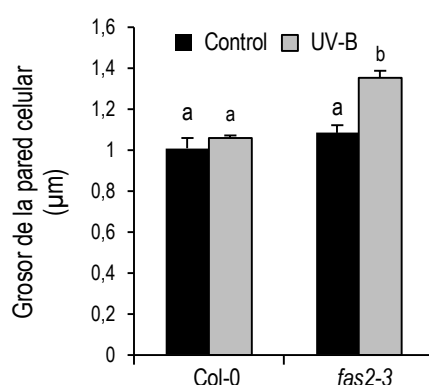
Con el objetivo de determinar los niveles de ploidía en el ADN de las hojas mutantes *fas2-3* tratadas con radiación UV-B, se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que en condiciones control las hojas de las plantas mutantes presentan núcleos con mayores niveles de ploidía que las hojas de la línea salvaje Col-0, con un marcado incremento en el contenido de ADN 16C y 32C+64C, como se reportó previamente (Figura 6.13a; Hisanaga y col., 2013). Esta diferencia se manifiesta en el índice de endorreduplicación (IE), que es más alto en las hojas de las mutantes *fas2-3* que en las hojas salvajes Col-0 (Figura 6.13b). Luego del tratamiento con UV-B, el IE de las hojas #5 de la línea salvaje Col-0 no se modifica, mientras que en la línea mutante *fas2-3* el IE aumenta levemente, pero de manera significativa (Figura 6.13b).



**Figura 6.13.** a) Porcentaje de núcleos que contienen ADN con distintos niveles de ploidía en las hojas #5 completamente desarrolladas de plantas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3*, que fueron irradiadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. b) Índice de endorreduplicación de las hojas #5 de las plantas salvajes y mutantes *fas2-3*, tratadas con UV-B o mantenidas en condiciones control. Las barras representan el promedio de triplicados biológicos y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 6.3.4. La radiación UV-B produce engrosamiento de la pared celular en las hojas de las plantas mutantes *fas2-3*.

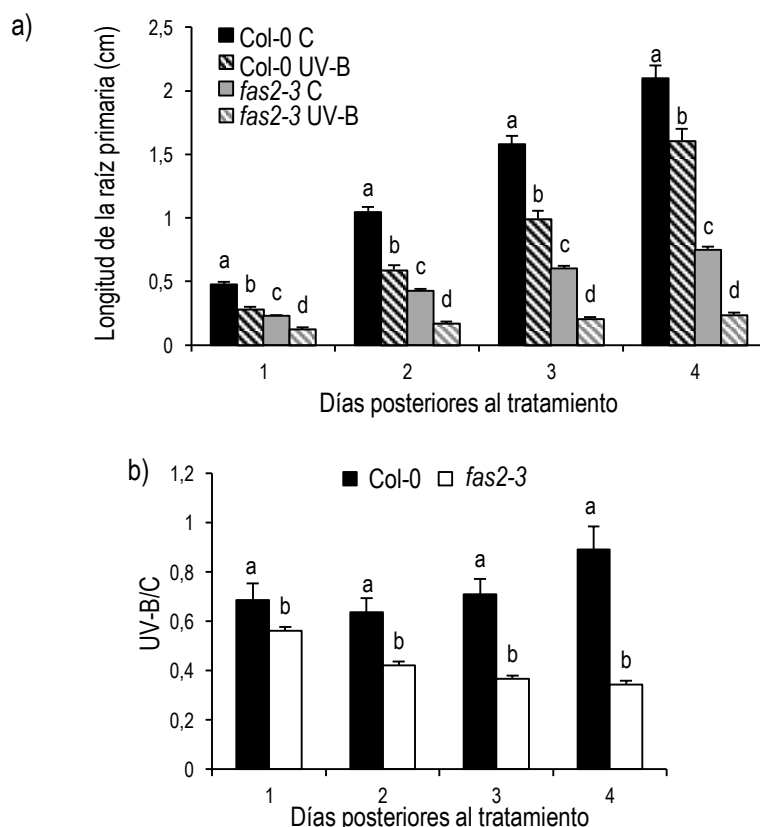
Al analizar el grosor de la pared de las células del parénquima en empalizada presentes en las hojas #5 de las plantas mutantes *fas2-3* y de las plantas salvajes Col-0, se determinó que en condiciones control es similar entre las dos líneas (Figura 6.14). Por otro lado, en las plantas Col-0 que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h, el grosor de la pared celular no se modifica, mientras que en las células de las hojas *fas2-3* aumenta significativamente (Figura 6.14).



**Figura 6.14.** Grosor de la pared de las células del parénquima en empalizada en las hojas #5 de plantas salvajes Col-0 y plantas mutantes *fas2-3*, que fueron irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 4 h o que permanecieron en condición control a los 12 días de crecimiento. Las barras representan el promedio de las medidas realizadas en 100 células y las barras de error corresponden al error estándar. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA  $p < 0,05$ . El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

#### 6.3.5. Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria en las plantas *fas2-3*.

En primer lugar, se analizó el efecto que causa la radiación UV-B sobre el crecimiento de la raíz primaria en las plantas salvajes Col-0 y en las plantas mutantes *fas2-3*. Los resultados obtenidos muestran que las raíces de la línea mutante *fas2-3* son más cortas que las de las plantas salvajes Col-0 en condiciones control de crecimiento (Figura 6.15a). Si bien aquellas raíces que fueron irradiadas con UV-B presentan una marcada disminución en su crecimiento, ésta disminución es mayor para las raíces de la línea mutante *fas2-3* que para las raíces de la línea salvaje Col-0 (Figura 6.15a). En la Figura 6.15b se representa la relación entre la longitud promedio de las raíces que fueron irradiadas con UV-B con respecto al promedio de las raíces que permanecieron en condiciones control, para los 4 días posteriores al tratamiento, en donde se puede observar que la radiación UV-B produce mayor inhibición del crecimiento de la raíz primaria en las plantas mutantes que en la raíz de las plantas salvajes.

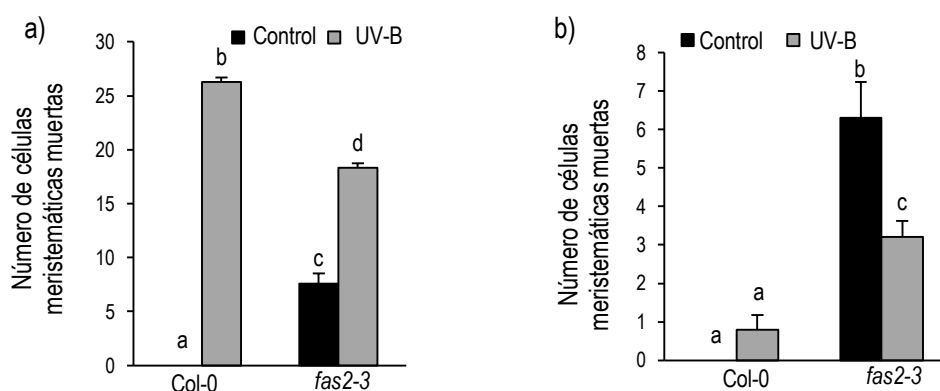


**Figura 6.15.** Análisis de la elongación de la raíz primaria de plántulas salvajes Col-0 y mutantes *fas2-3*, luego de ser expuestas a la radiación UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. a) Las barras representan la longitud promedio de la raíz primaria de 30 plantas de cada genotipo, en función de los días posteriores a los tratamientos. b) Las barras representan la relación entre los promedios de las raíces que recibieron radiación UV-B con respecto a las que permanecieron en condiciones control, en función de los días posteriores a los tratamientos. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA ( $p < 0,05$ ) o t de Student ( $p < 0,05$ ). El experimento se realizó por triplicado, obteniéndose resultados similares.

En segundo lugar, con el objetivo de evaluar si la inhibición en la elongación de la raíz primaria en las plantas mutantes *fas2-3* se debía a defectos en la inducción de la muerte celular programada (MCP), se registraron las células muertas en el meristema de estas raíces y se las comparó con las de las plantas salvajes Col-0. En condiciones control de crecimiento, las raíces de las plantas salvajes no presentan células meristemáticas muertas, mientras que las plantas mutantes *fas2-3* sí presentan células muertas en el meristema radicular, como había sido reportado anteriormente (Figura 6.16a; Ma y col., 2018). Sin embargo, al día siguiente de haber realizado el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h, tanto las raíces de las plantas salvajes Col-0 como las raíces de las plantas mutantes acumulan células muertas, siendo menor la cantidad de estas células en el meristema radicular de las plantas *fas2-3* (Figura 6.16a).

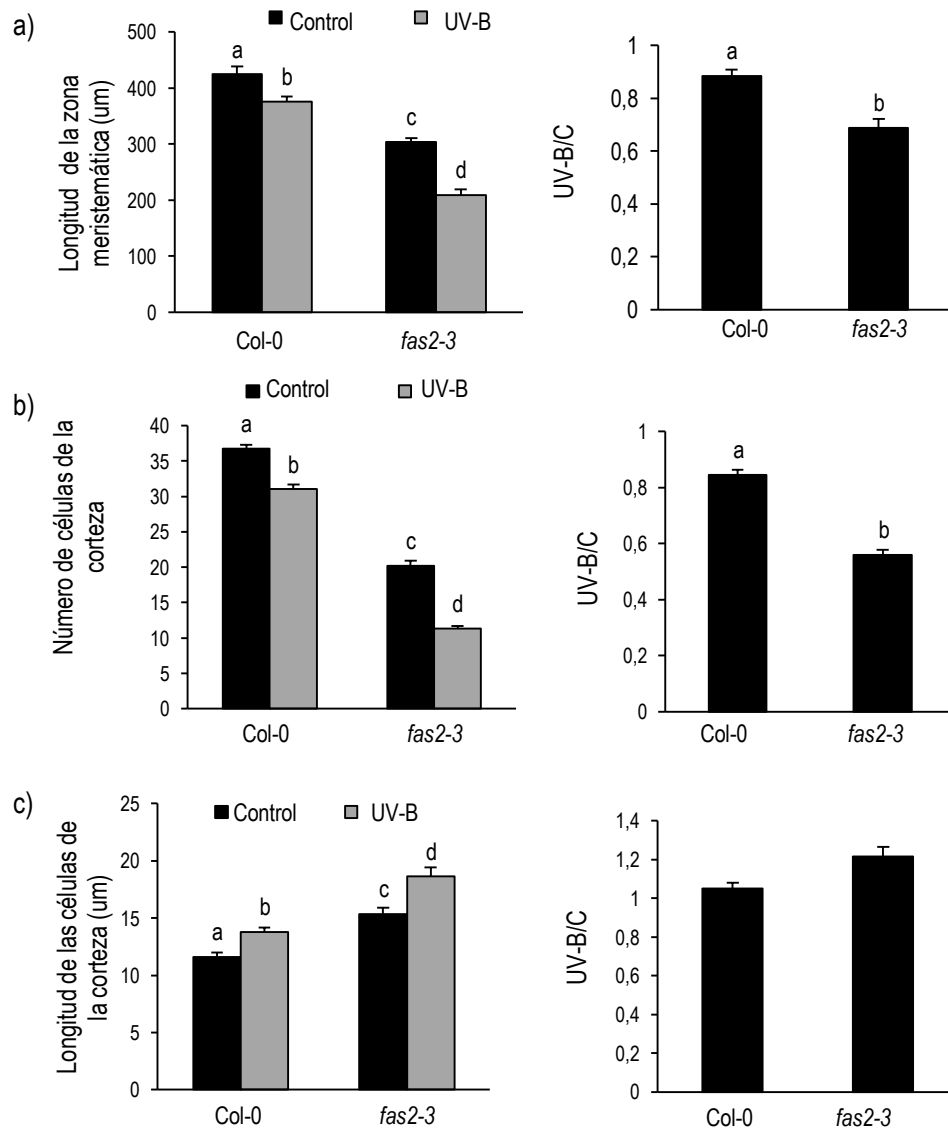
Por otro lado, cuatro días después de haber finalizado el tratamiento con UV-B, mientras que las células muertas en el meristema de las raíces salvajes son casi indetectables, las raíces de las plantas *fas2-3* aún contienen células meristemáticas muertas (Figura 6.16b).

A continuación, se procedió a analizar si las alteraciones en la MCP en la zona meristemática de las raíces mutantes *fas2-3* podían afectar el desarrollo del meristema. Para ello, se determinó la longitud del meristema, el número de células de la corteza y la longitud de la mismas en la zona meristemática, en las raíces de los dos genotipos a los 4 días de haber sido irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1h o de permanecer en condiciones control. Los resultados obtenidos muestran que la zona meristemática de las raíces *fas2-3* en condiciones control es más corta que la de las raíces de las plantas salvajes Col-0. Además, luego de la exposición a la radiación UV-B se produce una mayor disminución en la longitud del meristema de las raíces *fas2-3* que en las raíces salvajes (Figura 6.17a), como consecuencia de una mayor inhibición de la proliferación celular en las células de la corteza (Figura 6.17b). En cuanto a la longitud de estas células, la misma aumenta de manera similar en todos los genotipos analizados luego de que las raíces son irradiadas con UV-B (Figura 6.17c).



**Figura 6.16.** Número promedio de células meristemáticas muertas por raíz en la línea salvaje Col-0 y en la línea mutante *fas2-3* al día siguiente (a) o a los cuatro días (b) de haber finalizado el tratamiento con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. Las barras representan el promedio obtenido a partir del análisis de 40 raíces, y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba ANOVA ( $p < 0,05$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.





**Figura 6.17.** a) Longitud promedio de la zona meristemática de la raíz, b) número promedio de células de la corteza y c) longitud promedio de las células de la corteza en la zona meristemática de las raíces de plántulas salvajes Col-0 y de plántulas mutantes *fas2-3*, cuatro días después de haber sido irradiadas con UV-B ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ) por 1 h o de permanecer en condiciones control. Los gráficos del panel de la derecha representan el promedio de la relación UV-B/C para cada uno de los parámetros analizados en las dos líneas en estudio. Las barras de error corresponden al error estándar y las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar las pruebas ANOVA o t de Student ( $p < 0,05$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares.

## Capítulo 7

### Referencias bibliográficas



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, A.; Kumari, R.; Mehla, N.; Deepali Singh, R. P.; Bhatnagar, S.; Sharma, K.; Sharma, K.; Vashishtha, A. y Rathi, B. (2013) Depletion of the ozone layer and its consequences: A review. *Am J Plant Sci* 4, 1990-1997.
- Avvakumov, N. A.; Nourani, J. y Cote, J. (2011) Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell* 41, 502–514.
- Ballaré, C. L.; Rousseaux, M. C.; Searles, P. S.; Zaller, J. G.; Giordano, C. V.; Robson, T. M.; Caldwell, M. M.; Sala, O. E. y Scopel, A. L. (2001) Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *J Photochem Photobiol B* 62, 67–77.
- Barnes, P. W.; Flint, S. D.; Ryel, R. J.; Tobler, M. A.; Barkley, A. E. y Wargent, J. J. (2015) Rediscovering leaf optical properties: New insights into plant acclimation to solar UV radiation. *Plant Physiol Bioch* 93, 94-100.
- Barow M. y Meister A. (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ* 26, 571-584.
- Baucher, M.; Moussawi, J.; Vandeputte, O. M.; Monteyne, D.; Mol, A.; Pérez-Morga, D. y El Jaziri, M. (2013) A role for the miR396/GRF network in specification of organ type during flower development, as supported by ectopic expression of *Populus trichocarpa* miR396c in transgenic tobacco. *Plant Biol* 15, 892-898.
- Berckmans, B. y De Veylder, L. (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* 12, 599-605.
- Berckmans, B.; Lammens, T.; Van Den Daele, H.; Magyar, Z.; Bögre, L. y De Veylder, L. (2011) Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol* 157, 1440-1451.
- Bornman, J. F.; Reuber, S.; Cen, Y. O. y Weissenböck, G. (1997) Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. En: *Plants and UV-B: responses to environmental change*. Editor: Lumsden, P. J.; Cambridge, U.K: Cambridge Univ. Press, pp. 157-170.
- Boyes, D. C.; Zayed, A. M.; Ascenzi, R.; McCaskill, A. J.; Hoffman, N. E.; Davis, K. R. y Görlach J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*. A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499–1510.
- Bray, C. M. y West, C. E. (2005) DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 168, 511-528.

- Bresso, E. G.; Chorostecki, U.; Rodriguez, R. E.; Palatnik, J. F. y Schommer, C. (2018) Spatial control of gene expression by miR319-regulated TCP transcription factors in leaf development. *Plant Physiol* 176, 1694-1708.
- Brettel, K. y Byrdin, M. (2010) Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol* 20, 693-701.
- Breuer, C.; Braidwood, L. y Sugimoto, K. (2014) Endocycling in the path of plant development. *Curr Opin Plant Biol* 17, 78–85.
- Britt, A. B. (1996) DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 75-100.
- Britt, A. y Fiscus, E. L. (2003) Growth responses of Arabidopsis DNA repair mutants to solar irradiation. *Physiol Plant* 118, 183-192.
- Brown, B. A.; Cloix, C.; Jiang, G. H.; Kaiserli, E.; Herzyk, P.; Kliebenstein, D. J. y Jenkins, G. I. (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *P Natl Acad Sci USA* 102, 18225-18230.
- Burgess, R. J. y Zhang, Z. (2013) Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol* 20, 14–22.
- Canturk, F.; Karaman M.; Selby, C. P.; Kemp, M. G.; Kulaksiz-Erkmen, G.; Hu, J.; Li, W.; Lindsey-Boltz, L. A. y Sancar, A. (2016) Nucleotide excision repair by dual incisions in plants. *P Natl Acad Sci USA* 113, 4706-4710.
- Casadevall, R.; Rodriguez, R. E.; Debernardi, J. M.; Palatnik, J. F. y Casati, P. (2013) Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* 25, 3570-3583.
- Casati, P. y Walbot, V. (2004) Crosslinking of ribosomal proteins to RNA in maize ribosomes by UV-B and its effects on translation. *Plant Physiol* 136, 3319-3332.
- Chen, C.; Ridzon, D. A.; Broomer, A. J.; Zhou, Z.; Lee, D. H.; Nguyen, J. T.; Barbisin, M.; Xu, N. L.; Mahuvakar, V. R.; Andersen, M. R.; Lao, K. Q.; Livak, K. J. y Guegler, K. J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179.
- Chen, H.; Feng, Y.; Wang, L.; Yonezawa, T.; Crabbe, M. J. C.; Zhang, X. y Zhong, Y. (2014) Transcriptome profiling of the UV-B stress response in the desert shrub *Lycium ruthenicum*. *Mol Biol Rep* 42, 639-649.
- Choi, D.; Kim, J. H. y Kende, H. (2004) Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L). *Plant Cell Physiol* 45, 897-904.
- Ciccica, A. y Elledge, S. J. (2010) The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204.

- Corneillie, S.; De Storme, N.; Van Acker, R.; Fangel, J. U.; De Bruyne, M.; De Rycke, R.; Geelen, D.; Willats, W. G. T.; Vanholme, B. y Boerjan, W. (2019) Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiol* 179, 74-87.
- Costas, C.; Desvoyes, B. y Gutierrez, C. (2011) A chromatin perspective of plant cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta* 1809, 379–387.
- Cubas, P.; Lauter, N.; Doebley, J. y Coen, E. (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J* 18, 215–22.
- Culligan, K.; Tissier, A. y Britt, A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 1091–1104.
- Culligan, K. M.; Robertson, C. E.; Foreman, J.; Doerner, P. y Britt, A. B. (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J* 48, 947-961.
- Culligan, K. M. y Britt, A. B. (2008) Both ATM and ATR promote the efficient and accurate processing of programmed meiotic double-strand breaks. *Plant J* 55, 629-638.
- Curtis, M. J. y Hays, J. B. (2007) Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated *Arabidopsis* roots: requirements for DNA translesion polymerases eta and zeta. *DNA Repair (Amst)* 6, 1341-1358.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8, 512–522.
- Davey, M. P.; Susanti, N. I.; Wargent, J. J.; Findlay, J. E.; Paul Quick, W.; Paul, N. D. y Jenkins, G. I. (2012) The UV-B photoreceptor UVR8 promotes photosynthetic efficiency in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated levels of UV-B. *Photosynth Res* 114, 121-131.
- Debernardi, J. M.; Rodríguez, R. E.; Mecchia, M. A. y Palatnik, J. F. (2012) Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *PLoS Genet* 8 (1), e1002419.
- de Jager, S. M.; Scofield, S.; Huntley, R. P.; Robinson, A. S.; den Boer, B. G. W. y Murray J. A. H. (2009) Dissecting regulatory pathways of G1/S control in *Arabidopsis*: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol* 71, 345-365.
- De Veylder, L.; Beeckman, T.; Beemster, G. T. S.; de Almeida Engler, J.; Ormenese, S.; Maes, S.; Naudts, M.; Van Der Schueren, E.; Jacqmard, A.; Engler, G. e Inzé, D. (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21, 1360–1368.
- De Veylder, L.; Beeckman, T. e Inzé, D. (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 655-665.

- De Veylder, L.; Larkin, J. C. y Schnittger, A. (2011) Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci* 16, 624-634.
- del Pozo, J. C.; Boniotti, M. B. y Gutierrez, C. (2002) Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SCF<sup>AtSKP2</sup> Pathway in Response to Light. *Plant Cell* 14, 3057–3071.
- del Pozo, J. C.; Diaz-Trivino, S.; Cisneros, N. y Gutierrez, C. (2006) The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCF<sup>SKP2A</sup> Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 2224-2235.
- Donnelly, P.; Bonetta, D.; Tsukaya, H.; Dengler, R. y Dengler, N. (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* 215, 407-419.
- Dotto, M. y Casati, P. (2017) Developmental reprogramming by UV-B radiation in plants. *Plant Sci* 267, 96-101.
- Dotto, M.; Gómez, M. S.; Soto, M. S. y Casati, P. (2018) UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 421, 1394-1406.
- Eberharter, A. y Becker, P. B. (2002) Histone acetylation: A switch between repressive and permissive chromatin. Second in review on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229.
- El-Aouar Filho, R. A.; Nicolas, A.; De Paula Castro, T. L.; Deplanche, M.; De Carvalho Azevedo, V. A.; Goossens, P. L.; Taieb, F.; Lina, G.; Le Loir, Y. y Berkova, N. (2017) Heterogeneous family of cyclomodulins: smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 208.
- Emiliani, J.; Grotewold, E.; Falcone Ferreyra, M. L. y Casati, P. (2013) Flavonols protect Arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Mol Plant* 6, 1376-1379.
- Endo, M.; Ishikawa, Y.; Osakabe, K.; Nakayama, S.; Kaya, H.; Araki, T.; Shibahara, K.; Abe, K.; Ichikawa, H.; Valentine, L.; Hohn, B. y Toki, S. (2006) Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants. *EMBO J* 25, 5579-5590.
- Ercoli, M. F.; Ferela, A.; Debernardi, J. M.; Perrone, A. P.; Rodriguez, R. E. y Palatnik, J. F. (2018) GIF Transcriptional Co-regulators Control Root Meristem Homeostasis. *Plant Cell* 30, 347-359.
- Exner, V.; Taranto, P.; Schonrock, N.; Gruissem, W. y Hennig, L. (2006) Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* 133, 4163-4172.
- Falcone Ferreyra, M. L.; Casadevall, R.; D'Andrea, L.; AbdElgawad, H.; Beemster, G. T. S. y Casati, P. (2016) AtPDCC5 plays a role in programmed cell death after UV-B exposure in Arabidopsis. *Plant Physiol* 170, 2444-2460.

- Falcone Ferreyra, M. L.; Rius, S. P. y Casati, P. (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 3, 222.
- Fankhauser, C. y Chory J. (1997) Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 203-229.
- Favory, J. J.; Stec, A.; Gruber, H.; Rizzini, L.; Oravecz, A.; Funk, M.; Albert, A.; Cloix, C.; Jenkins, G. I.; Oakeley, E. J.; Seidlitz, H. K.; Nagy, F. y Ulm, R. (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J* 28, 591-601.
- Filiz, E.; Koc, I. y Tombuloglu, H. (2014) Genome-wide identification and analysis of growth regulating factor genes in *Brachypodium distachyon*: in silico approaches. *Turkish J Biol* 38, 296-306.
- Fina, J. P.; Masotti, F.; Rius, S. P.; Crevacuore, F. y Casati, P. (2017) HAC1 and HAF1 Histone acetyltransferases have different roles in UV-B responses in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 8, 1179.
- Flint, S. D.; Ryel, R. J. y Caldwell, M. M. (2003) Ecosystem UV-B experiments in terrestrial communities: A review of recent findings and methodologies. *Agric For Meteorol* 120, 177-189.
- Flynn, R. L. y Zou, L. (2011) ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci* 36, 133-140.
- Franco-Zorrilla, J. M.; Valli, A.; Todesco, M.; Mateos, I.; Puga, M. I.; Rubio-Somoza, I.; Leyva, A.; Weigel, D.; García, J. A. y Paz-Ares, J. (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39, 1033-1037.
- Friedberg, E. C.; Bardwell, A. J.; Bardwell, L.; Feaver, W. J.; Kornberg, R. D.; Svejstrup, J. Q.; Tomkinson, A. E. y Wang, Z. (1995) Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, 63-8.
- Fulcher, N. y Sablowski, R. (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *P Natl Acad Sci USA* 106, 20984-20988.
- Furukawa, T.; Curtis, M. J.; Tominey, C. M.; Duong, Y. H.; Wilcox, B. W. L.; Aggoune, D.; Hays, J. B. y Britt, A. B. (2010) A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair (Amst)* 9, 940-948.
- Gerhardt, K. E.; Wilson, M. I. y Greenberg, B. M. (1999) Tryptophan photolysis Leads to a UVB-induced 66 kDa photoproduct of ribulose-1, 5 bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol* 70, 49-56.
- Giacomelli, J. I.; Weigel, D.; Chan, R. L. y Manavella, P. A. (2012) Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. *New Phytol* 195, 766-773.
- Gill, S. S. y Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48, 909-930.

- González Besteiro, M. A.; Bartels, S.; Albert, A. y Ulm, R. (2011) Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant J* 68, 727-737.
- González Besteiro, M. A. y Ulm, R. (2013) ATR and MKP1 play distinct roles in response to UV-B stress in Arabidopsis. *Plant J* 73, 1034-1043.
- Green, C. M. y Almouzni, G. (2003) Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *EMBO J* 22, 5163-5174.
- Gutierrez, C. (2009) The Arabidopsis cell division cycle. *Arabidopsis Book* 7:e0120.
- Gutierrez, C.; Ramirez-Parra, E.; Castellano, M. M. y del Pozo, J. C. (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin in Plant Biol* 5, 480-486.
- Hanawalt, P. C. (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21, 8949–8956.
- Hase, Y.; Trung, K. H.; Matsunaga, T. y Tanaka, A. (2006) A mutation in the *uvi4* gene promotes progression of endo-reduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *Plant J* 46, 317-326.
- Hays, J. B. (2002) *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair* 1, 579–600.
- Hayama, R. y Couplnad, G. (2003) Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 6, 13-19.
- Hectors, K.; Prinsen, E.; De Coen, W.; Jansen, M. y Guisez, Y. (2007) *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytol* 175, 255-270.
- Hefner, E.; Preuss, S. B. y Britt, A. B. (2003) Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* 54, 669-680.
- Heijde, M. y Ulm, R. (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci* 17, 230-237.
- Heijde, M. y Ulm, R. (2013) Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *P Natl Acad Sci USA* 110, 1113-1118.
- Hewezi, T.; Maier, T. R.; Nettleton, D. y Baum, T. J. (2012) The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiol* 159, 321-335.
- Heyman, J. y De Veylder, L. (2012) The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Mol Plant* 5, 1182-1194.



- Hisanaga, T.; Ferjani, A.; Horiguchi, G.; Ishikawa, N.; Fujikura, U.; Kubo, M.; Demura, T.; Fukuda, H.; Ishida, T.; Sugimoto, K. y Tsukaya, H. (2013) The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the *fas1* mutation during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol* 162, 831-841.
- Hoek, M. y Stillman, B. (2003) Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *P Natl Acad Sci USA* 100, 12183–12188.
- Horiguchi, G.; Kim, G. T. y Tsukaya, H. (2005) The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43, 68-78.
- Horvath, B. M.; Kourova, H.; Nagy, S.; Nemeth, E.; Magyar, Z.; Papdi, C.; Ahmad, Z.; Sanchez-Perez, G. F.; Perilli, S.; Blilou, I.; Pettkó-Szandtner, A.; Darula, Z.; Meszaros, T.; Binarova, P.; Bogre, L. y Scheres, B. (2017) Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J* 36, 1261-1278.
- Ingram, G. C. y Waites, R. (2006) Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr Opin Plant Biol* 9, 12–20.
- Inzé, D. y De Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40, 77-105.
- Jansen, M.; Gaba, V. y Greenberg, B. M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci* 3, 131-135.
- Jenkins, G. I. (2009) Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation. *Annu Rev Plant Biol* 60, 407-431.
- Jenkins, G. I. (2017) Photomorphogenic responses to ultraviolet-B light. *Plant Cell Environ* 40, 2544-2557.
- Jiang, C. Z.; Yen, C. N.; Cronin, K.; Mitchell, D.; y Britt, A. B. (1997) UV- and gamma- radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 147, 1401-1409.
- Jiang, L.; Wang, Y.; Björn, L. O. y Li, S. (2011) Does cell cycle arrest occur in plant under solar UV-B radiation? *Plant Signal Behav* 6, 892-894.
- Johnson, R. A.; Conklin, P. A.; Tjahjadi, M.; Missirian, V.; Toal, T.; Brady, S. M. y Britt, A. B. (2018) SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 Links DNA Damage Response to Organ Regeneration. *Plant Physiol* 176, 1665–1675.
- Jones-Rhoades, M. W. y Bartel, D. P. (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14, 787-799.
- Kaiserli, E. y Jenkins, G. I. (2007) UV-B promotes rapid nuclear translocation of the Arabidopsis UV-B–specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *Plant Cell* 19, 2662-2673.

- Kantar, M.; Lucas, S. J. y Budak, H. (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233, 471–484.
- Kaya, H.; Shibahara, K. I.; Taoka, K. I.; Iwabuchi, M.; Stillman, B. y Araki, T. (2001) FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104, 131-142.
- Kim, J. H.; Choi, D. y Kende, H. (2003) The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* 36, 94–104.
- Kim, J. H. y Kende, H. (2004) A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *P Natl Acad Sci USA* 101, 13374–13379.
- Kimura, S. y Sakaguchi, K. (2006) DNA repair in plants. *Chem Rev* 106, 753-766.
- Kirik, A.; Pecinka, A.; Wendeler, E. y Reiss, B (2006) The Chromatin Assembly Factor subunit FASCIATA1 is involved in homologous recombination in plants. *Plant Cell* 18, 2431–2442.
- Kliebenstein, D. J.; Lim, J. E.; Landry, L. G. y Last, R. L. (2002) Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol* 130, 234-243.
- Kondorosi, E., y Kondorosi, A. (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett* 567, 152–157.
- Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2002) DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J* 30, 337–348.
- Kramer, G. F.; Norman, H. A.; Krizek, D. T. y Mirecki, R. M. (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30, 2101-2108.
- Kunz, B. A.; Anderson, H. J.; Osmond, M. J. y Vonarx, E. J. (2005) Components of nucleotide excision repair and DNA damage tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Mol Mutagen* 45, 115-127.
- Lammens, T.; Boudolf, V.; Kheibarshekan, L.; Panagiotis Zalmas, L.; Gaamouche, T.; Maes, S.; Vanstraelen, M.; Kondorosi, E.; La Thangue, N. B.; Govaerts, W.; Inzé, D. y De Veylder, L. (2008) Atypical E2F activity restrains APC/C<sup>CCS52A2</sup> function obligatory for endocycle onset. *P Natl Acad Sci USA* 105, 14721-14726.
- Lammens, T.; Li, J.; Leone, G. y De Veylder, L. (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol* 19, 111–118.
- Landry, L. G.; Chapple, C. C. S. y Last, R. L. (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109, 1159-1166.
- Landry, L. G.; Stapleton, A. E.; Lim, J.; Hoffman, P.; Hays, J. B.; Walbot, V. y Last, R. L. (1997) An Arabidopsis photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *P Natl Acad Sci USA* 94, 328-332.

- Lario, L. D.; Ramirez-Parra, E.; Gutierrez, C.; Spampinato, C. P. y Casati, P. (2013) ANTI-SILENCING FUNCTION1 proteins are involved in ultraviolet-induced DNA damage repair and are cell cycle regulated by E2F transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162, 1164-1177.
- Lee, H. O.; Davidson, J. M. y Duronio, R. J. (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23, 2461-2477.
- Leyser, H. M. y Furrer, I. J. (1992) Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 116, 397-403.
- Li, C.; Potuschak, T.; Colon-Carmona, A.; Gutierrez, R. A. y Doerner, P. (2005) *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *P Natl Acad Sci USA* 102, 12978-12983.
- Li, J.; Ou-Lee, T. M.; Raba, R.; Amundson, R. G. y Last, R. L. (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5, 171-179.
- Li, N.; Teranishi, M.; Yamaguchi, H.; Matsushita, T.; Watahiki, M.; Tsuge, T.; Li, S. y Hidema, J. (2015) UV-B-induced CPD photolyase gene expression is regulated by UVR8-dependent and -independent pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 56, 2014-2023.
- Liang, T.; Mei, S.; Shi, C.; Yang, Y.; Peng, Y.; Ma, L.; Wang, F.; Li, X.; Huang, X.; Yin, Y. y Liu, H. (2018) UVR8 interacts with BES1 and BIM1 to regulate transcription and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 44, 512-523.
- Lim, S. y Kaldis, P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079-3093.
- Liu, H.-H.; Tian, X.; Li, Y.-J.; Wu, C.-A. y Zheng, C.-C. (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14, 836-843.
- Liu, J.; Hua, W.; Yang, H.-L.; Zhan, G.-M.; Li, R.-J.; Deng, L.-B.; Wang, X.-F.; Liu, G.-H. y Wang, H.-Z. (2012) The BnGRF2 gene (GRF2-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *J Exp Bot* 63, 3727-3740.
- Liu, J.; Rice, J. H.; Chen, N.; Baum, T. J. y Hewezi, T. (2014) Synchronization of developmental processes and defense signaling by growth regulating transcription factors. *PLoS One* 9, e98477.
- Liu, Z.; Hossain, G. S.; Islas-Osuna, M. A.; Mitchell, D. L.; y Mount, D. W. (2000) Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *Plant J* 21, 519-528.
- Liu, Z.; Hong, S. W.; Escobar, M.; Vierling, E.; Mitchell, D. L.; Mount, D. W. y Hall, J. D. (2003) *Arabidopsis* UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol* 132, 1405-1414.
- Lockshin, R. A. y Zakeri, Z. (2004a) Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.

- Lockshin, R. A. y Zakeri, Z. (2004b). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2405-2419.
- López-Juez, E.; Dillon, E.; Magyar, Z.; Khan, S.; Hazeldine, S.; de Jager, S. M.; Murray, J. A. H.; Beemster, G. T. S.; Bögre, L. y Shanahan, H. (2008) Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 947–968.
- Loyola, A. y Almouzni, G. (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* 1677, 3-11.
- Lu, X-Y. y Huang, X-L. (2008) Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 458–462.
- Ma, J.; Liu, Y.; Zhou, W.; Zhu, Y.; Dong, A. y Shen, W-H. (2018) Histone chaperones play crucial roles in maintenance of stem cell niche during plant root development. *Plant J* 95, 86-100.
- Magyar, Z.; De Veylder, L.; Atanassova, A.; Bakó, L.; Inzé, D. y Bögre, L. (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating 12 auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17, 2527–2541.
- Magyar, Z.; Horvath, B.; Khan, S.; Mohammed, B.; Henriques, R.; De Veylder, L.; Bako, L.; Scheres, B. y Bogre, L. (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J* 31, 1480-1493.
- Manova, V. y Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Front Plant Sci* 6, 885.
- Mariconti, L.; Pellegrini, B.; Cantoni, R.; Stevens, R.; Bergounioux, C.; Cella, R. y Albani, D. (2002) The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem* 277, 9911–9919.
- Martin-Trillo, M. y Cubas, P. (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* 15, 31–39.
- McGinty, R. y Tan, S. (2014) Histone, nucleosome, and chromatin structure. En: *Fundamentals of Chromatin*. Editores: Workman, J. L. y Abmayr, S. M.; Springer; New York; pp. 1–28.
- Melaragno, J. E.; Mehrotra, B. y Coleman, A. W. (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5, 1661–1668.
- Mello, J. A. y Almouzni, G. (2001) The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr Opin Genet Dev* 11, 136–141.
- Menges, M.; de Jager, S. M.; Gruissem, W. y Murray, J. A. H. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546-566.

- Mozgova, I.; Mokros, P. y Fajkus, J. (2010) Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 2768-2780.
- Mozgova, I.; Wildhaber, T.; Liu, Q.; Abou-Mansour, E.; L'Haridon, F.; Metraux, J. P.; Gruissem, W.; Hofius, D. y Hennig, L. (2015) Chromatin assembly factor CAF-1 represses priming of plant defence response genes. *Nat Plants* 1, 15127.
- Muchova, V.; Amiard, S.; Mozgova, I.; Dvorackova, M.; Gallego, M. E.; White, C. y Fajkus, J. (2015) Homology-dependent repair is involved in 45S rDNA loss in plant CAF-1 mutants. *Plant J* 81, 198-209.
- Murray, J. A. H.; Doonan, J.; Riou-Khamlichi, C.; Meijer, M. y Oakenfull, E. A. (2001) G1 cyclins, cytokinins and the regulation of the G1/S transition. En: *The plant cell cycle and its interfaces*, 3<sup>o</sup> Ed; Editor: Francis, D.; CRC Press, Sheffield Academic Press, pp. 19–41.
- Oak, A. S. W.; Athar, M.; Yusuf, N. y Elmets, C. A. (2018) UV and Skin: Photocarcinogenesis. En: *Environment and Skin*; Editores: Krutmann, J. y Merk, H. F.; Springer, Cham; pp. 67-103.
- Ogita, N.; Okushima, Y.; Tokizawa, M.; Yamamoto, Y. Y.; Tanaka, M.; Seki, M.; Makita, Y.; Matsui, M.; Okamoto-Yoshiyama, K.; Sakamoto, T.; Kurata, T.; Hiruma, K.; Saijo, Y.; Takahashi, N. y Umeda, M. (2018) Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *Plant J* 94, 439-453.
- Omidbakhshfard, M. A.; Proost, S.; Fujikura, U. y Mueller-Roeber, B. (2015) Growth-Regulating Factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol Plant* 8, 998-1010.
- Otero, S.; Desvoyes, B. y Gutierrez, C. (2014) Histone H3 dynamics in plant cell cycle and development. *Cytogenet Genome Res* 143, 114-124.
- Palatnik, J. F.; Allen, E.; Wu, X.; Schommer, C.; Schwab, R.; Carrington, J. C. y Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263.
- Park, Y. J. y Luger, K. (2008) Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr Opin Struct Biol* 18, 282–289.
- Pfluger, J. y Wagner, D. (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10, 645–652.
- Pholo, M.; Coetzee, B.; Maree, H. J.; Young, P. R.; Lloyd, J. R.; Kossmann, J. y Hills, P. N. (2018) Cell division and turgor mediate enhanced plant growth in *Arabidopsis* plants treated with the bacterial signalling molecule lumichrome. *Planta* 248, 477-488.
- Piazza, P.; Jasinski, S. y Tsiantis, M. (2005) Evolution of leaf developmental mechanisms. *New Phytol* 167, 693-710.

- Polo, S. E.; Roche, D. y Almouzni, G. (2006) New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127, 481-493.
- Polyn, S.; Willems, A. y De Veylder, L. (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr Opin Plant Biol* 23, 1–7.
- Prado, F.; Cortés-Ledesma, F. y Aguilera, A. (2004) The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange. *EMBO Rep* 5, 497–502.
- Radziejwoski, A.; Vlieghe, K.; Lammens, T.; Berckmans, B.; Maes, S.; Jansen, M. A. K.; Knappe, C.; Albert, A.; Seidlitz, H. K.; Bahnweg, G.; Inzé, D. y De Veylder, L. (2011) Atypical E2F activity coordinates PHR1 photolyase gene transcription with endoreduplication onset. *EMBO J* 30, 355-363.
- Ramirez-Parra, E. y Gutierrez, C. (2007a). E2F regulates FASCIATA1, a chromatin assembly gene whose loss switches on the endocycle and activates gene expression by changing the epigenetic status. *Plant Physiol* 144, 105–120.
- Ramirez-Parra, E. y Gutierrez, C. (2007b) The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci* 12, 570-576.
- Rastogi, R. P.; Ashor Kumar, R.; Tyagi, M. B. y Sinha, R. P. (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* ID 592980.
- Reape, T. J.; Molony, E. M. y McCabe, P. F. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J Exp Bot* 59, 435–444.
- Reyes, J. C.; Hennig, L. y Gruissem, W. (2002) Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiol* 130, 1090–1101.
- Rizzini, L.; Favory, J. J.; Cloix, C.; Faggionato, D.; O'Hara, A.; Kaiserli, E.; Baumeister, R.; Schäfer, E.; Nagy, F.; Jenkins, G. I. y Ulm R. (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 80, 103-106.
- Rodríguez, R. E.; Mecchia, M. A.; Debernardi, J. M.; Schommer, C.; Weigel, D. y Palatnik, J. F. (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137, 103-112.
- Rodriguez, R. E.; Ercoli, M. F.; Debernardi, J. M.; Breakfield, N. W.; Mecchia, M.; Sabatini, M.; Cools, T.; De Veylder, L.; Benfey, P. y Palatnik, J. F. (2015) MicroRNA miR396 regulates the switch between stem cells and transit-amplifying cells in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 27, 3354-3366.
- Rosa, S. y Shaw, P. (2013) Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology* 2, 1378-410.

- Rose, J. K. C.; Braam, J.; Fry, S. C. y Nishitani, K. (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43, 1421-1435.
- Rossi, V. y Varotto, S. (2002) Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* 215, 345–356.
- Ruban, A. V. (2014) Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis. *J Exp Bot* 66, 7-23.
- Rymen, B. y Sugimoto, K. (2012) Tuning growth to the environmental demands. *Curr Opin Plant Biol* 15, 683-690.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2º Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sancar, A. (2016) Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease. (Nobel lecture) *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 8502-8527.
- Sasidharan, R.; Voesenek, L. A. y Pierik, R. (2011) Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Crit Rev Plant Sci* 30, 548-562.
- Shepherd, T. y Griffiths, W. D. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171, 469–499.
- Schommer, C.; Debernardi, J. M.; Bresso, E. G.; Rodriguez, R. E. y Palatnik, J. F. (2014) Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Mol Plant* 7, 1533-1544.
- Schönrock, N.; Exner, V.; Probst, A.; Gruissem, W. y Hennig, L. (2006) Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 281, 9560-9568.
- Searles, P. S.; Flint, S. D. y Caldwell, M. M. (2001) A meta analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127, 1–10.
- Sharma, S.; Chatterjee, S.; Kataria, S.; Joshi, J.; Datta, S.; Vairale, M. G. y Veer, V. (2017) A review on responses of plants to UV-B radiation. En: UV-B Radiation: Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth; Editores: Singh, V. P.; Singh, S.; Prasad, S. M. y Parihar, P.; Jhon Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK; pp 74-75.
- Shen, J.; Xie, K. y Xiong, L. (2010) Global expression profiling of rice microRNAs by one-tube stem-loop reverse transcription quantitative PCR revealed important roles of microRNAs in abiotic stress responses. *Mol Genet Genomics* 284, 477–488.
- Shen, W-H. (2002) The plant E2F–Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* 7, 505-511.
- Sozzani, R.; Maggio, C.; Varotto, S.; Canova, S.; Bergounioux, C.; Albani, D. y Cella, R. (2006) Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol* 140, 1355–1366.

- Srikanth, A. y Schmid, M. (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci* 68, 2013-2037.
- Stapleton, A. E. y Walbot, V. (1994) Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* 105, 881-889.
- Steinmüller, D. y Tevini, M. (1985) Action of UV radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* 164, 557-564.
- Sugimoto-Shirasu, K. y Roberts, K. (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6, 544-553.
- Thiagarajan, V.; Byrdin, M.; Eker, A. P. M.; Müller, P. y Brettel, K. (2011) Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV. *P Natl Acad Sci USA* 108, 9402-9407.
- Todesco, M.; Rubio-Somoza, I.; Paz-Ares, J. y Weigel, D. (2010) A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 6, e1001031.
- Triantaphylides, C. y Havaux, M. (2009) Singlet oxygen in plants: Production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14, 219-228.
- Trimarchi, J. M. y Lees, J. A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 11-20.
- Tripathi, A. K.; Singh, K.; Pareek, A. y Singla-Pareek, S. L. (2015) Histone chaperones in Arabidopsis and rice: genome-wide identification, phylogeny, architecture and transcriptional regulation. *BMC Plant Biology* 15, 42.
- Tsukaya, H. (2006) Mechanism of leaf-shape determination. *Annu Rev Plant Biol* 57, 477-496.
- Uemukai, K.; Iwakawa, H.; Kosugi, S.; de Jager, S.; Kato, K.; Kondorosi, E.; Murray, J. A. H.; Ito, M.; Shinmyo, A. y Sekine, M. (2005) Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by cotransfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* 57, 83-100.
- Ulm, R.; Baumann, A.; Oravecz, A.; Máté, Z.; Adám, E.; Oakeley, E. J.; Schäfer, E. y Nagy, F. (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *P Natl Acad Sci USA* 101, 1397-1402.
- Ulm, R. y Jenkins, G. I. (2015) Q&A: How do plants sense and respond to UV-B radiation? *BMC Biology* 30, 13-45.
- Vaillant, I. y Paszkowski, J. (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 10, 528-533.
- van den Heuvel, S. y Dyson, N. J. (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Bio* 9, 713-724.



- Vandepoele, K.; Raes, J.; De Veylder, L.; Rouze, P.; Rombauts, S. e Inzé, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 903-916.
- Vandepoele, K.; Vlieghe, K.; Florquin, K.; Hennig, L.; Beemster, G. T. S.; Grissem, W.; Van de Peer, Y.; Inzé, D. y De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* 139, 316–328.
- van der Knaap, E.; Kim, J. H. y Kende, H. (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* 122, 695–704.
- Varas, J.; Sanchez-Moran, E.; Copenhaver, G. P.; Santos, J. L. y Pradillo, M. (2015) Analysis of the relationships between DNA double-strand breaks, synaptonemal complex and crossovers using the *Atfas1-4* mutant. *PLoS Genet* 1, e1005301.
- Varas, J.; Santos, J. L. y Pradillo, M. (2017) The absence of the Arabidopsis chaperone complex CAF-1 produces mitotic chromosome abnormalities and changes in the expression profiles of genes involved in DNA repair. *Front Plant Sci* 8, 525.
- Varkonyi-Gasic, E.; Wu, R.; Wood, M.; Walton, E. F. y Hellens, R. P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3, 12.
- Verbsky, M. L. y Richards, E. J. (2001) Chromatin remodeling in plants. *Curr Opin Plant Biol* 4, 494-500.
- Vercruyssen, L.; Tognetti, V. B.; Gonzalez, N.; Van Dingenen, J.; De Milde, L.; Bielach, A.; De Rycke, R.; Van Breusegem, F. e Inzé, D. (2015) GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates Arabidopsis chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant Physiol* 167, 817-32.
- Vlieghe, K.; Boudolf, V.; Beemster, G. T. S.; Maes, S.; Magyar, Z.; Atanassova, A.; de Almeida Engler, J.; De Groodt, R.; Inze, D. y De Veylder, L. (2005) The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 15, 59–63.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136, 669–687.
- Yoshiyama, K.; Conklin, P. A.; Huefner, N. D. y Britt, A. B. (2009) Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *P Natl Acad Sci USA* 106, 12843-12848.
- Yoshiyama, K. O.; Kimura, S.; Maki, H.; Britt, A. B. y Umeda, M. (2014) The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant Signal Behav* 9, e28889.
- Yoshiyama, K. O.; Kobayashi, J.; Ogita, N.; Ueda, M.; Kimura, S.; Maki, H. y Umeda, M. (2013a) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Rep* 14, 817–822.
- Yoshiyama, K. O.; Sakaguchi, K. y Kimura, S. (2013b) DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals. *Biology* 2, 1338-1356.

- Wang, F.; Qiu, N.; Ding, Q.; Li, J.; Zhang, Y.; Li, H. y Gao, J. (2014) Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* 15, 807.
- Wang, H.; Qi, Q.; Schorr, P.; Cutler, A. J.; Crosby, W. L. y Fowke, L. C. (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* 15, 501-510.
- Waterworth, W. M. (2002) Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* 53, 1005-1015.
- Weinberg, R. A. (1995) The Retinoblastoma protein and cell-cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5, 218-223.
- Zhang, D-F.; Li, B.; Jia, G-Q.; Zhang, T-F.; Dai, J-R.; Li, J-S. y Wang, S-C. (2008) Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci* 175, 809–817.
- Zhang, X-Q.; Wei, P-C.; Xiong, Y-M.; Yang, Y.; Chen, J. y Wang, X-C. (2011) Overexpression of the Arabidopsis  $\alpha$ -expansin gene AtEXPA1 accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. *Plant Cell Rep* 30, 27–36.
- Zhao, X.; Harashima, H.; Dissmeyer, N.; Pusch, S.; Weimer, A. K.; Bramsiepe, J.; Bouyer, D.; Rademacher, S.; Nowack, M. K.; Novak, B.; Sprunck, S. y Schnittger, A. (2012) A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 8, e1002847.
- Zhou, L.; Liu, Y.; Liu, Z.; Kong, D.; Duan, M. y Luo, L. (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot* 61, 4157–4168.
- Zhou, X.; Wang, G. y Zhang, W. (2007) UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 3, 103.
- Zhu, Y.; Weng, M.; Yang, Y.; Zhang, C.; Li, Z.; Shen, W-H. y Dong, A. (2011) Arabidopsis homologues of the histone chaperone ASF1 are crucial for chromatin replication and cell proliferation in plant development. *Plant J* 66, 443–455.
- Zhu, Y.; Dong, A. y Shen, W-H. (2012) Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* 1819, 343-348.